

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01805990.2

[51] Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 1 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 100455599C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 27/14 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

[22] 申请日 2001.3.2 [21] 申请号 01805990.2

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 3 [33] JP [31] 059508/00

[32] 2000.12.28 [33] JP [31] 401563/00

[86] 国际申请 PCT/JP2001/001656 2001.3.2

[87] 国际公布 WO2001/064754 日 2001.9.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.3

[73] 专利权人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 设乐研也 花井陈雄 庄司绘美

樱田干子 古谷安希子 中村和靖

丹羽伦平 柴田健志 山崎基生

审查员 韩世炜

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 杨 青 樊卫民

权利要求书 6 页 说明书 65 页 附图 18 页

[54] 发明名称

基因重组抗体及其抗体片段

[57] 摘要

本发明涉及一种与人 CCR4 胞外区域特异作用的基因重组抗体或抗体片段；一种编码所述基因重组抗体或抗体片段的 DNA；一种产生所述基因重组抗体或抗体片段的方法；一种免疫学检测 CCR4 的方法，一种免疫学检测在细胞表面表达 CCR4 的细胞的方法，一种用于减少或去除在细胞表面表达 CCR4 的细胞的方法，以及一种用于抑制 Th2 细胞因子产生的方法，每一种均使用上述的基因重组抗体或其片段；用于 Th2 - 介导的免疫疾病的药物、治疗剂或诊断剂和用于血癌的治疗剂或诊断剂，每种均含有上述的基因重组抗体或其片段作为活性成分。

1. 一种重组抗体或抗体片段,其识别存在于人 CCR4 的 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列中的第 2-29 位中的表位,其中所述表位被保藏号为 FERM BP-7054 的转化子 KM2760 产生的抗体 KM2760 所识别。
2. 如权利要求 1 中所述的重组抗体或抗体片段,其可以与 CCR4-表达细胞特异性地作用。
3. 如权利要求 1 中所述的重组抗体或抗体片段,其具有抗 CCR4-表达细胞的细胞毒性活性。
4. 如权利要求 3 所述的重组抗体或抗体片段,其中,所述抗 CCR4-表达细胞的细胞毒性活性高于源于非人动物的杂交瘤所产生的单克隆抗体的细胞毒性活性。
5. 如权利要求 3 所述的重组抗体或抗体片段,其中,所述细胞毒性活性是抗体-依赖的细胞-介导的细胞毒性(ADCC)活性。
6. 如权利要求 5 所述的重组抗体或抗体片段,其中,所述抗体-依赖的细胞-介导的细胞毒性活性是指诱导 Th2 细胞凋亡的活性。
7. 如权利要求 1 中所述的重组抗体或抗体片段,其具有去除 Th2 细胞的活性。
8. 如权利要求 1 中所述的重组抗体或抗体片段,其具有抑制 Th2 细胞因子产生的活性。
9. 如权利要求 8 所述的重组抗体或抗体片段,其中所述的 Th2 细胞因子是 IL-4, IL-5 或 IL-13。
10. 如权利要求 1 中所述的重组抗体,其中所述重组抗体是选自人源化抗体和人抗体。
11. 如权利要求 10 所述的重组抗体,其中,所述人源化抗体是人嵌合抗体或人 CDR-移植抗体。

12. 如权利要求 1 中所述的重组抗体, 其属于人 IgG 抗体。

13. 如权利要求 10 所述的重组抗体, 其中, 所述人源化抗体包括:
抗体重链 (H 链) 可变区 (V 区) 的互补决定区 (CDR) 1, CDR2
和 CDR3, 其具有分别由 SEQ ID NO: 5, 6 和 7 所示的氨基酸序列;
且

抗体轻链 (L 链) V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3, 其具有分别由
SEQ ID NO: 8, 9 和 10 所示的氨基酸序列。

14. 如权利要求 11 所述的重组抗体, 其中, 所述人嵌合抗体包括:
一个可以与 CCR4 特异反应的单克隆抗体的抗体重链 (H 链) 可
变区 (V 区) 和抗体轻链 (L 链) V 区; 和
一个人抗体的 H 链恒定区 (C 区) 和 L 链 C 区。

15. 如权利要求 14 所述的重组抗体, 其中, 所述人嵌合抗体包括:
抗体 H 链 V 区的互补决定区 (CDR) 1, CDR2 和 CDR3, 其具有
分别由 SEQ ID NO: 5, 6 和 7 所示的氨基酸序列; 且

抗体 L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3, 其具有分别由 SEQ ID
NO: 8, 9 和 10 所示的氨基酸序列。

16. 如权利要求 14 所述的重组抗体, 其中, 所述人嵌合抗体包括:
H 链 V 区具有在 SEQ ID NO: 15 中所示的氨基酸序列中的第
20-138 位的氨基酸; 且

L 链 V 区具有在 SEQ ID NO: 16 中所示的氨基酸序列中的第 20-132
位的氨基酸。

17. 如权利要求 11 所述的重组抗体, 其中, 所述人嵌合抗体是
通过保藏号为 FERM BP-7054 的转化子 KM2760 产生的抗体 KM2760,
且其中该抗体的 H 链 C 区属于人 IgG1 亚类。

18. 如权利要求 11 所述的重组抗体, 其中, 所述人 CDR-移植抗
体包括:

与 CCR4 特异反应的单克隆抗体的抗体重链 (H 链) 可变区 (V
区) 的和抗体轻链 (L 链) V 区的互补决定区 (CDR); 和

人抗体的 H 链和 L 链的 C 区以及 V 区框架区。

19、如权利要求 18 所述的重组抗体，其中，所述人 CDR-移植抗体包括：

H 链 V 区的 CDR1，CDR2 和 CDR3，其具有分别由 SEQ ID NO：5，6 和 7 所示的氨基酸序列；和

L 链 V 区的 CDR1，CDR2 和 CDR3，其具有分别由 SEQ ID NO：8，9 和 10 所示的氨基酸序列。

20. 一种编码如权利要求 1-19 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段的 DNA。

21. 一种包含有如权利要求 20 所述 DNA 的重组载体和一种用于人源化抗体表达的串联载体。

22. 一种如权利要求 21 所述的重组载体导入宿主细胞的转化子。

23. 如权利要求 22 所述的转化子，其中，所述转化子是保藏号为 FERM BP-7054 的 KM2760。

24. 一种产生重组抗体或抗体片段的方法，其中包括培养如权利要求 22 或 23 中的任一项所述的转化子，在培养基中产生和积累重组抗体或抗体片段，和从培养基中回收重组抗体或抗体片段。

25. 如权利要求 10 所述的重组抗体，其中，所述人抗体包括抗体重链（H 链）可变区（V 区）和/或抗体轻链（L 链）V 区。

26. 如权利要求 25 所述的重组抗体，其中，所述人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的互补决定区（CDR）包含的氨基酸序列与和 CCR4 特异反应的单克隆抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 CDR 各自的氨基酸序列相同。

27. 如权利要求 26 所述的重组抗体，其中，所述人抗体包括：

H 链 V 区的 CDR1，CDR2 和 CDR3，其具有分别由 SEQ ID NO：5，6 和 7 所示的氨基酸序列；和

L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3, 其具有分别由 SEQ ID NO: 8, 9 和 10 所示的氨基酸序列。

28. 如权利要求 25 所述的重组抗体, 其中, 所述人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区包含的氨基酸序列各自与和 CCR4 特异反应的单克隆抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区各自的氨基酸序列相同。

29. 如权利要求 28 所述的重组抗体, 其中, 所述人抗体包括:

H 链 V 区, 其中含有在 SEQ ID NO: 15 中所示的氨基酸序列中的第 20—138 位的氨基酸; 和/或

L 链 V 区, 其中含有在 SEQ ID NO: 16 中所示的氨基酸序列中的第 20—132 位的氨基酸。

30. 如权利要求 25 中所述的重组抗体, 其中, 所述人抗体是从人噬菌体抗体文库中或产生人抗体的转基因动物中得到的抗体。

31. 如权利要求 1 中所述的抗体片段, 其为 Fab, Fab', F(ab')₂, 单链抗体, 二硫键固定的 V 区片段, 或包含抗体互补决定区 (CDR) 的肽。

32. 如权利要求 31 所述的抗体片段, 其中, 所述抗体片段包括抗体的抗体重链 (H 链) 可变区 (V 区) 和抗体轻链 (L 链) 的 V 区。

33. 如权利要求 32 所述的抗体片段, 其中, 所述抗体片段的 H 链 V 区和 L 链 V 区的互补决定区 (CDR) 包含的氨基酸序列与和 CCR4 特异反应的单克隆抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 CDR 各自的氨基酸序列相同。

34. 如权利要求 33 所述的抗体片段, 其中包括:

H 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 分别具有由 SEQ ID NO: 5, 6 和 7 所示的氨基酸序列; 和

L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 分别具有由 SEQ ID NO: 8, 9 和 10 所示的氨基酸序列。

35. 如权利要求 32 所述的抗体片段, 其中, 所述抗体片段的 H 链

V 区和 L 链 V 区包含的氨基酸序列与和 CCR4 特异反应的单克隆抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区各自的氨基酸序列相同。

36. 如权利要求 35 所述的抗体片段, 其中包括:

具有在 SEQ ID NO: 15 中所示氨基酸序列中的第 20—138 位氨基酸的 H 链 V 区; 和/或

具有在 SEQ ID NO: 16 中所示氨基酸序列中的第 20—132 位的氨基酸的 L 链 V 区。

37. 一种重组抗体或抗体片段, 其为如权利要求 1 所述的重组抗体或抗体片段, 通过化学的或基因工程的方法接合了放射性同位素、蛋白或试剂。

38. 一种免疫学检测 CCR4 的方法, 其中包括使用如权利要求 1 到 19 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

39. 一种免疫学检测在细胞表面表达 CCR4 的细胞的方法, 其中包括使用如权利要求 1 到 19 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

40. 一种使用如权利要求 1 到 19 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段制备用于减少或去除在细胞表面表达 CCR4 的细胞的药物中的用途。

41. 一种使用如权利要求 1 到 29 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段制备用于抑制 Th2 细胞因子产生的药物中的用途。

42. 一种药物, 其含有权利要求 1 到 19 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段为活性成分。

43. 一种用于 Th2-介导的免疫疾病的治疗剂或诊断剂, 其含有如权利要求 1 到 19 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段为活性成分。

44. 一种用于血癌的治疗剂, 其中作为活性成分, 含有如权利要

求 1 到 19 和 25 到 37 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

45. 如权利要求 44 所述的治疗剂，其中，所述血癌是白血病。

基因重组抗体及其抗体片段

技术领域

本发明涉及与人类 CC 亚家族趋化因子受体 4(下文称作“CCR4”)的胞外域具有特异性作用的重组抗体及其抗体片段。此外,本发明也涉及人源化抗体、人抗体等重组抗体以及这些抗体的片段,它们特异地与 CCR4 作用、具有细胞毒性和抑制 Th2 细胞产生细胞因子的活性、并且包括一个特异性的互补性决定区(下文称作“CDR”)。此外,本发明也涉及编码以上提及的抗体的 DNA。另外,本发明还涉及包含该 DNA 的载体和由此载体转化的转化子。进一步而言,本发明还涉及利用该转化子制造以上提及的抗体的方法,和用于 Th2-介导的免疫疾病如变应性疾病等的治疗剂、诊断剂等药物,其中包括应用该抗体。仍进一步而言,本发明还涉及用于癌症如血癌,例如白血病的诊断剂和治疗剂等药物,其中包括应用该抗体。

发明背景

诸如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、IgE 等多种因子与变应性疾病有关,例如支气管哮喘。嗜酸性粒细胞渗透进入到发炎部位,释放一种细胞毒性碱性蛋白如 MBP(主要碱性蛋白)或其它类似物,因而通过去粒引起周围组织受损。肥大细胞释放组胺,通过与由 B 细胞产生的 IgE 结合为一种抗原免疫复合物以便引发即发型变应反应。它们是由参与细胞间的信号传导的诸如细胞因子、趋化因子等生物学功能分子控制的。嗜酸性粒细胞被 IL-5 分化诱导且延长了寿命,经过进一步诱导发生去粒。由 IL-4 激活的 B 细胞产生 IgE,与抗原一起变成免疫复合物,加速了肥大细胞的去粒作用。已发现肥大细胞可以产生 IL-4、IL-13 及类似物,它们也作用于 B 细胞产生 IgE 的过程,已证实存在一个变态反应增强环路(Am.J.Respir.Crit.Care.Med., 152: 2059 (1995), Immunol.Today,15:19) 1994)。所以,在发炎细胞之间存在一个精细的细胞因子-趋化因子的网络,并且可以保持复杂的平衡。

细胞因子和趋化因子由辅助 T 细胞产生,其在细胞表面表达 CD4

(下文中称为“CD4+Th 细胞”)。实际上在支气管哮喘病人的导气管发炎部位明显地发现了辅助 T 细胞的渗透物,其中有相当数量的 T 细胞被激活,并且哮喘的严重程度和导气管超敏性程度与活化的 T 细胞数目相关,而且活化的 T 细胞在外周血中也有增加。(Am.Rev.Respir. Dis.,145:s22(1992))。

辅助 T 细胞依赖于其产生的细胞因子的不同分为 Th1 细胞和 Th2 细胞 (Annu.Rev.Immunol.,7:145(1989))。由 Th2 细胞产生的细胞因子的实例包括 IL-4、IL-5、IL-13 等。

已经发现分离自特应性疾病的病人的一个抗原特异性的 T 细胞克隆在体外受刺激时,释放 Th2 细胞因子 (Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A., 88: 4538 (1991)),并且 Th2 细胞存在于支气管肺泡灌洗液(下文中称为“BAL”)和哮喘病人的导气管粘膜中 (N.Engl.J.Med.,326:298 (1992).Eur.J.Immunol., 23:1445(1993))。当通过一个变态发炎的动物模型来检查 mRNA 在 BAL 中的表达时, Th2 细胞的细胞因子 IL-4 和 IL-5 表现增加。(Clin.Immunol.Immunopathol.,75:75(1995))。当小鼠中诱导的 Th2 细胞被施用到静脉和鼻腔时,在肺部引发一种抗原特异性的哮喘样发炎症状 (J. Exp. Med.,186: 1737(1997), J.Immunol.,160:1378 (1998)) 和引起嗜酸粒细胞增多 (J. Immunol.,161:3128(1998))。在哮喘病人的导气管粘膜上和特应性皮炎病人的损害中观察到 IL-5 的表达。(J. Clin. Invest.,87:1541(1991), J. Exp.Med.,173:775(1991)),并且在连续性的过敏性鼻炎的粘膜中 IL-13 的表达水平与血清中的总 IgE 数量和抗原特异性的 IgE 呈现相关性 (Therapeutics,32: 19(1998))。

趋化因子是具有白细胞迁移和白细胞活化功能的碱性肝素结合蛋白的总称,且根据保守的 cys 残基在一级结构中的位置分为 CXC, CC, C 和 CX₃C 亚家族。迄今为止,已经确定了 16 种趋化因子的受体 (Curr. Opi. Immunol., 11: 626(1999)),并且已经证明出在每一个白细胞如 Th1 细胞, Th2 细胞等的表面上,每一种趋化因子受体的表达是不同的 (Cell Engineering, 17:1022(1998))。

人的 CCR4 是一个跨膜 7 次的 G 蛋白复合受体,已经从人非成熟的嗜碱细胞系 KU-812 中克隆,命名为 K5-5,其氨基酸序列表示在 SEQ ID NO:17 中。由于认为 CCR4 的跨膜区是氨基酸序列中的第 40-67

位,第78-97位,第113-133位,第151-175位,第207-226位,第243-270位和第285-308位。胞外区被认为是第1-39位,第98-112位,第176-206位,和第271-284位,且胞内区是位于第68-77位,第134-150位,第227-242位和第309-360位(J.Biol. Chem., 270:19495(1995))。据报道,在进行克隆时,CCR4的配体是MIP-1 α (巨嗜细胞炎症蛋白1 α), RANTES(受激活作用调节的正常T细胞表达并可能分泌的蛋白质)或MCP-1 α (巨嗜细胞趋化蛋白-1 α) (Biochem,Biophys,Res.Comm., 218:337 (1996), WO96/23068)。然而,其后发现受刺激的人外周血单核细胞(下文称作“PBMC”)和胸腺细胞(J.Biol.chem.,271:21514(1996))产生的TARC(胸腺和激活作用调节性趋化因子-)与CCR4特异性结合(J.Biol.Chem.,272:15036(1997))。也有报道说分离于巨噬细胞的MDC(源于巨噬细胞的趋化因子)(J. Exp.Med.,185:1595(1997)),也称为STCP-1(刺激T细胞趋化性蛋白-1)(J.Biol..Chem.,272: 25229(1997)),与CCR4的结合比TARC更强(J. Biol.Chem., 273:1764(1998))。

已经证明CCR4在产生细胞因子和/或趋化因子的CD4+Th细胞中被表达(J.Biol.Chem.,272:15036(1997)),且有报道说CCR4选择性地表达于CD4+Th2细胞中的Th2细胞中(J.Exp.Med.,187:129(1998), J. Immunol.,161:5111(1998))。此外,已经发现CCR4+细胞是属于效应/记忆T细胞(CD4+/CD45RO+)组,且当CCR4+细胞受到刺激,产生IL-4和IL-5,但不产生IFN- γ (Int.Immunol.,11:81(1999))。也有报道说CCR4+属于记忆T细胞中的一个CLA(皮肤淋巴细胞抗原)-阳性和 $\alpha 4 \beta 8$ 整连蛋白-阴性组中,且CCR4表达于与消化道免疫无关而于皮肤及其类似物的系统性免疫有关的记忆T细胞上(Nature, 400: 776 (1999))。这些结果有力地暗示一种可能性,也就是通过炎症诱导激活的记忆T细胞表达CCR4,通过配体、MDC和TRAC迁移至炎症部位,且加速了其它炎性细胞的激活。

就目前治疗Th2-介导的免疫疾病而言,已经发展了以下方法:(1)细胞因子和趋化因子的拮抗剂,例如一种人源化抗-IL-5抗体(SB-240563:Smith Kline Beecham,Sch-55700(CDP-835): Shehling Plaw/Celltech),一种人源化IL-4抗体(US专利5,914,110),一种可溶性趋化因子

受体 (J.Immunol.,160:624(1998)), 等等; (2) 细胞因子趋化因子产生抑制剂, 例如一种 IL-5 产生抑制剂 (日本公开的未经过实审的专利申请 53355/96), 一种类维生素 A 拮抗剂 (WO 99/24024), splatast tosil ate(IPD-1151T,由 Taiho Pharmaceutical 制造), 等等; (3) 用于嗜酸性粒细胞、肥大细胞等最终炎细胞的药剂, 例如一种人源化 IL-5 受体抗体 (WO97/10354), 一种 CC 趋化因子受体 3 (CCR3) 的拮抗剂(日本公开的未经过实审的专利申请 147872/99), 等; (4) 炎症分子抑制剂例如一种人源化抗-IgE 抗体 (Am. J.Respir.Crit.Care Med.,157:1429(1998)) 等及类似物。但是它们只是抑制细胞因子趋化因子和炎性细胞的精密网络中的一部分, 所以并不是根本办法。抗-CD4 抗体有能力控制 T 细胞, 且对于严重的类固醇依赖性哮喘有效。可是, 由于 CD4 分子广泛地表达于各种免疫细胞, 它们缺乏特异性,并且具有伴随着的强免疫抑制效应的缺陷(Int.Arch.Aller.Immunol.,118:133(1999))。

所以, 为了抑制所有这些, 需要特异地控制产生问题的变态反应的上游, 即 Th2 细胞。

对于严重的 Th2 介导的免疫疾病的病人, 目前应用的主要治疗方法是使用类固醇, 但不能避免类固醇的副作用。同时具有当暂停使用后, 每一个病人的状况又回复到以前的病例状态的缺点, 并且当类固醇使用一段时间后又会产生抗药性。

至今, 还没有建立这样的单克隆抗体, 即可以检测到 CCR4-表达细胞, 并且同时对 CCR4-表达细胞具有细胞毒性。此外, 目前还没有一种可以抑制 Th2 细胞因子产生的治疗剂。

尽管已经有报道, CCR4 也表达于白血病 (Blood, 96: 685 (2000)), 但是目前还没有可以杀伤白血病细胞的治疗剂。

一般认为, 将一种来自一种非-人动物的抗体, 如, 一种鼠源抗体, 给人使用时, 它被识别为外来物质并且在人体中诱导人抗体来对抗鼠源抗体 (人抗-鼠抗体: 下文称为“HAMA”)。已知 HAMA 与使用的鼠抗体反应引起副作用(J.Clin.Oncol., 2: 881(1984); Blood, 65: 1349 (1985); J. Natl.Cancer Inst., 80: 932(1988); Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,82:1242(1985)), 并且加速使用的鼠源抗体从身体中的消失 (J.Nucl.med., 26:1011(1985),Blood,65:1349(1985), J.Natl.Cancer Inst.,80:937(19

88)), 且降低了鼠源抗体的治疗效果 (J.Immunol. 135:1530(1985), Cancer Res., 46:6489(1986))。

为了解决这些问题, 试图应用基因工程技术转化一种来自非人动物的抗体为人源化抗体, 如, 人嵌合抗体, 人互补决定区 (下文称为 “CDR”) -移植抗体或类似物。人嵌合抗体是一种抗体, 其中该抗体的可变区 (下文称为 “V” 区) 是一个来自非人动物的抗体, 而其恒定区 (下文称为 “C” 区) 是来自于一个人抗体 (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,81:6851(1984))。人 CDR-移植抗体是一种抗体, 其中来自于非人动物的抗体 V 区的 CDR 的氨基酸序列是被移植于人抗体的相应位置上 (Nature,321:522(1986))。与来自于非人动物如鼠抗体等抗体相比较, 这些人源化抗体在临床应用上具有多种优点。例如, 考虑到免疫原性和血液中的稳定性, 有报道说一种人嵌合抗体在血液中的半寿期, 大约是使用于人的鼠抗体的 6 倍。(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,86:4220(1989))。在应用人 CDR-移植抗体中, 有报道说其免疫原性降低, 并且在猴试验中其血清半寿期是实验中鼠抗体的 4-5 倍 (J.Immunol.,147:1352(1991))。所以期望人源化抗体与来自于非人动物的抗体相比具有更小的副作用, 且其治疗效果可以持续更长的时间。同时, 尤其是在降低 CCR4-表达细胞数量上的治疗中, 通过抗体的 Fc 区 (此区包括重链铰链区和其后区域) 发挥作用的更高的细胞毒性, 如补体-依赖的细胞毒性 (下文称为 “CDC” 活性), 抗体依赖的细胞-介导的细胞毒性 (下文称为 “ADCC” 活性) 等等, 对于治疗效果很重要。有报道说在这些细胞毒性中, 人的抗体优于来自于非人动物的抗体, 因为人抗体的 Fc 区域比源于非人动物抗体的 Fc 区可以更有效地激活人补体成分和在细胞表面具有 Fc 受体的人效应细胞, 例如单核细胞, 巨噬细胞, 天然杀伤细胞 (NK 细胞), 等等。例如, 有报道说人效应细胞的肿瘤细胞毒性在人嵌合抗体中增加, 该嵌合抗体通过转换一个鼠源的针对 GD2 的抗体的 Fc 区域为人抗体的 Fc 区域 (J.Immunol.,144:1382(1990)), 并且对于针对 CAMPATH-1 抗原的人 CDR-移植抗体也有类似的结果报道 (Nature,332:323(1988))。

这些结果明确地证明, 在作为抗体用于人的临床应用中时, 人源化抗体优选于源自非人动物的抗体如鼠抗体等。

此外,按照最近蛋白质工程和基因工程的进展,可以产生具有相对小的分子量的抗体片段,例如 Fab, Fab', F(ab)₂, 单链抗体(下文称为“scFv”)(Science,242:423(1988)),二硫键稳定的V区片段(下文称为“dsFv”)等等(Molecular Immunol.,32:249(1995))。由于这些片段的分子量小于完整的抗体分子,在进入靶组织的转移能力上,它们很优秀(Cancer Res.,52:3402(1992))。在临床应用于人的过程中,人们认为源于人源化抗体的这些片段优于那些源于非人动物如鼠的抗体的片段。

正如以上所述,单独使用源于人源化抗体和抗体片段具有可以期待的诊断和治疗效果,但是已经尝试通过联合使用其它分子来更进一步增强效果。例如,细胞因子可以作为这种分子之一加以使用。细胞因子是对在免疫反应中控制胞内相互作用的多种可溶性因子的总称。例如,CDC活性和ADCC活性是已知的抗体细胞毒性,且ADCC活性是被在细胞表面上具有Fc受体的效应细胞如单核细胞、巨噬细胞、NK细胞等控制的(J.Immunol.,138:1992(1987))。由于多种细胞因子活化这些效应细胞,为了增加抗体的ADCC的活性等,它们可以与一个抗体一并使用。

发明概述

抗体通过重链(下文称为“H链”)的V区域的CDR和轻链(下文称为“L链”)与相应的抗原结合,并且CDR的氨基酸序列控制与抗体的结合反应性和结合特异性(J.Exp.Med.,132:211(1970))。这样,就需要一个抗-CCR4的抗体,其含有包括新的氨基酸序列并且和人CCR4特异结合的CDR,其具有诸如结合反应性、细胞毒性等等的一些特性,并且其与那些已知的CCR4抗体不同。此外,需要可以选择性地去除CCR4-表达Th2细胞例如细胞因子-产生细胞的抗体,可以抑制Th2细胞因子的产生的抗体,和应用此种抗体的诊断药剂和治疗剂。而且还需要在诊断和治疗血液癌症如白血病中有用的方法,白血病是由于造血细胞等发生肿瘤发生性转化所致。

本发明的发明人已获得来自于杂种瘤KM2160中的编码抗体H链和L链的cDNA,该杂交瘤可以产生针对CCR4的鼠单克隆抗体,属于

IgG1 类；已经发现 V 区域 CDR 具有新的氨基酸序列，并且已经构建了一个人源化抗体表达载体，是通过克隆具有新的 CDR 的、编码 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 至一个动物细胞表达载体中而构建，该载体具有编码人抗体 H 链 C 区和人抗体 L 链 C 区的 cDNA 序列。通过把该表达载体导入动物细胞，表达抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760，并且纯化。本发明通过证实该抗体特异地与人 CCR4 反应，且通过其具有的强细胞毒性降低了抗原-阳性细胞的数量，通过在人体中应用该抗体显示其实用性而予以完成。

此外，本发明人通过确定针对 CCR4 的一种重组抗体可以以高频率地与白血病细胞，特别是 T 细胞白血病细胞反应，并且通过其强大的细胞毒性降低了 CCR4-阳性白血病细胞的数量，并且通过在诊断和治疗如人白血病等血癌中显示该抗体的实用性，完成了本发明。

本发明涉及下述的（1）到（47）。

（1）一种重组抗体或抗体片段，其可以特异性地与人 CCR4 的胞外区作用。

（2）如（1）所述的重组抗体或抗体片段，其中所述胞外区是选自在 SEQ ID NO: 17 中所示的氨基酸序列中的第 1-39 位，第 98-112 位，第 176-206 位，第 271-284 位的胞外结构域。

（3）如（1）或（2）所述的重组抗体或抗体片段，可以识别存在于在 SEQ ID NO: 17 中所示的氨基酸序列中的第 2-29 位中的一段表位。

（4）如（1）到（3）中的任一项所述的重组抗体或抗体片段，其可与 CCR4-表达细胞特异性作用。

（5）如（1）到（4）中的任一项所述的重组抗体或抗体片段，其含有对 CCR4-表达细胞具有细胞毒性。

细胞毒性的实例中包括 CDC 活性，ADCC 活性等。

（6）如（5）所述的重组抗体或抗体片段，其中所述抗 CCR4-表达细胞的细胞毒性高于源于非人动物杂交瘤产生的单克隆抗体。

术语“细胞毒性高于源于非人动物杂交瘤产生的单克隆抗体”是指所得的重组抗体的细胞毒性高于源于非人动物杂交瘤产生的单克隆抗体的细胞毒性，其特异地与应用于制造重组抗体的 CCR4 作用，其

将在下文叙述。

(7) 如(5)所述的重组抗体或抗体片段, 其中所述细胞毒性是抗体-依赖的细胞-介导的细胞毒性(ADCC)活性。

(8) 如(7)所述的重组抗体或抗体片段, 其中所述抗体-依赖的细胞-介导的细胞毒性活性是指诱发 Th2 细胞凋亡的活性。

(9) 如(1)到(8)中的任一项所述的重组抗体或抗体片段, 其含有去除 Th2 细胞的活性。

(10) 如(1)到(9)中的任一项所述的重组抗体或抗体片段, 其含有抑制 Th2 细胞因子产生的活性。

(11) 如(10)中所述的重组抗体或抗体片段, 其中 Th2 细胞因子是 IL-4, IL-5 或 IL-13。

(12) 如(1)到(11)中的任一项所述的重组抗体, 其中所述的重组抗体是选自人源化抗体和人抗体。

(13) 如(12)中所述的重组抗体, 其中所述的人源化抗体是人嵌合抗体或人 CDR-移植抗体。

(14) 如(1)到(13)的任一项所述的重组抗体, 其属于人 IgG 抗体。

(15) 如(12)中所述的重组抗体, 其中所述的人源化抗体包括:

抗体重链(H链)可变区(V区)的互补决定区(CDR)1, CDR2 和 CDR3 分别具有在 SEQ ID NO: 5, 6 和 7 中所示的氨基酸序列; 且

抗体轻链(L链)的V区的CDR1, CDR2 和 CDR3 分别具有在 SEQ ID NO: 8, 9 和 10 中所示的氨基酸序列。

(16) 如(13)中所述的重组抗体, 其中所述的人的嵌合抗体包括:

与 CCR4 特异反应的单克隆抗体的抗体重链(H链)可变区(V区)和抗体的轻链(L链)的V区; 且

人抗体的H链恒定区(C区)和L链C区。

(17) 如(16)中所述的重组抗体, 其中所述的人嵌合抗体包括: H链V区的互补决定区(CDR)1, CDR2 和 CDR3 分别具有在

SEQ ID NO: 5, 6 和 7 中所示的氨基酸序列; 且

L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 分别具有在 SEQ ID NO: 8, 9 和 10 中所示的氨基酸序列。

(18) 如 (16) 中所述的重组抗体, 其中所述的人嵌合抗体包括:

H 链 V 区具有在 SEQ ID NO: 15 中所示的氨基酸序列中的第 20-138 位的氨基酸; 且

L 链 V 区具有在 SEQ ID NO: 16 中所示的氨基酸序列中的第 20-132 位的氨基酸。

(19) 如 (13) 中所述的重组抗体, 其中所述的人的嵌合抗体是一种产自转化的 KM2760 ((FERM BP-7054) 的抗体 KM2760, 且其中, 其抗体 H 链 C 区属于人 IgG1 亚类。

(20) 如 (13) 中所述的重组抗体, 其中所述的人 CDR-移植抗体包括:

与 CCR4 特异地作用的单克隆抗体的抗体重链 (H 链) 可变区 (V 区) 的互补决定区 (CDR) 和抗体轻链 (L 链) V 区; 且

人抗体的 H 链和 L 链的 C 区和 V 区框架区。

(21) 如 (13) 中所述的重组抗体, 其中所述的人 CDR-移植抗体包括:

H 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 具有分别在 SEQ ID NO: 5, 6 和 7 中所示的氨基酸序列; 且

L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 具有分别在 SEQ ID NO: 8, 9 和 10 中所示的氨基酸序列。

(22) 编码如 (1) 到 (21) 中任一项所述的重组抗体或抗体片段的 DNA。

(23) 含有如 (22) 所述的 DNA 的重组载体饱和用于人源化抗体表达的串联载体。

(24) 将如 (22) 所述的重组载体的导入宿主细胞的转化子。

(25) 如 (24) 所述的转化子, 其中所述转化子是 KM2760 (FERM BP-7054)

(26) 制造重组抗体或抗体片段的方法, 其中包括培养如 (24) 或 (25) 所述的转化子于培养基中生产和积累重组抗体或抗体片段,

和从培养基中回收重组抗体或抗体片段。

(27) 如(12)所述的重组抗体, 其中所述人抗体包括抗体重链(H链)可变区(V区)和/或抗体轻链(L链)V区。

(28) 如(27)所述的重组抗体, 其中所述人抗体的H链V区和L链V区的互补决定区(CDR)包含的氨基酸序列分别与可以和CCR4特异地作用的单克隆抗体的H链V区和L链V区的CDR具有的氨基酸序列相同。

(29) 如(28)所述的重组抗体, 其中所述人抗体包括:

H链V区的CDR1, CDR2和CDR3具有分别在SEQ ID NO: 5, 6和7中所示的氨基酸序列; 且

L链V区的CDR1, CDR2和CDR3具有在SEQ ID NO: 8, 9和10中所分别表示的氨基酸序列。

(30) 如(27)所述的重组抗体, 其中所述人抗体的H链V区和L链V区包含的氨基酸序列分别与可以和CCR4特异地作用的单克隆抗体的H链V区和L链V区的氨基酸序列相同。

(31) 如(30)所述的重组抗体, 其中所述人抗体包括:

H链V区具有在SEQ ID NO: 15中所示的氨基酸序列中的第20-138位氨基酸; 和/或

L链V区具有在SEQ ID NO: 16中所示的氨基酸序列中的第20-132位的氨基酸。

(32) 如(27)到(31)中的任一项所述的重组抗体, 其中所述人抗体是从人噬菌体抗体库中得到或从可以产生人抗体的转基因动物中得到。

(33) 如(1)到(11)中的任一项所述的抗体片段, 其是Fab, Fab'; F(ab')₂, 单链抗体, 二硫键稳定的V区片段, 或含有抗体互补决定区(CDR)的肽。

(34) 如(33)所述的抗体片段, 其中包括抗体重链(H链)可变区(V区)和抗体的轻链(L链)V区。

(35) 如(34)所述的抗体片段, 其中所述抗体片段的H链V区和L链V区的互补决定区(CDR)包含的氨基酸序列分别与可以和CCR4特异地作用的单克隆抗体的H链V区和L链V区的互补决定区(C

DR) 的氨基酸序列的相同。

(36) 如 (35) 所述的抗体片段, 其包括:

H 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 具有分别在 SEQ ID NO: 5, 6 和 7 中所示的氨基酸序列; 且

L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3 具有在 SEQ ID NO: 8, 9 和 10 中所分别表示的氨基酸序列。

(37) 如 (34) 所述的抗体片段, 其中所述抗体片段的 H 链 V 区和 L 链 V 区包含的氨基酸序列分别与可以和 CCR4 特异地作用的单克隆抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的氨基酸序列相同。

(38) 如 (37) 所述的抗体片段, 其中包括:

H 链 V 区具有在 SEQ ID NO: 15 中所示的氨基酸序列中第 20-138 位氨基酸; 和

L 链 V 区具有在 SEQ ID NO: 16 中所示的氨基酸序列中第 20-132 位的氨基酸。

(39) 一种重组抗体或抗体片段, 其是如 (1) 到 (21) 和 (27) 到 (38) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段, 其与一种放射性同位素, 一种蛋白或一种药剂通过化学或遗传学方法接合在一起。

(40) 用免疫学方法检测 CCR4 的方法, 其中包括使用如 (1) 到 (21) 和 (27) 到 (39) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

例如, 样品中的 CCR4 可以使用免疫学方法通过使用重组抗体或抗体片段与样品接触来检测。

(41) 用免疫学方法检测在细胞表面表达 CCR4 细胞的方法, 其中包括使用如 (1) 到 (21) 和 (27) 到 (39) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

例如, 一种在细胞表面表达 CCR4 的细胞可以通过让重组抗体或抗体片段与细胞接触的免疫方法来检测。

(42) 一种降低和去除在细胞表面表达 CCR4 的细胞的方法, 包括使用如 (1) - (21) 和 (27) 到 (39) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

例如, 在细胞表面表达 CCR4 的细胞可以通过使用有效量的针对人或动物的重组抗体或抗体片段的方法来减少或去除。

(43) 一种抑制 Th2 细胞因子产生的方法，其中包括使用如 (1) 到 (21) 和 (27) 到 (39) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

例如，Th2 细胞因子的产生可以通过使用有效量的针对人或动物的重组抗体或抗体片段的方法来抑制。

(44) 一种药物，包括作为活性成分的如 (1) - (21) 和 (27) 到 (39) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

(45) 一种用于 Th2-介导的免疫疾病的诊断剂或治疗剂，包括作为活性成分的如 (1) - (21) 和 (27) 到 (39) 中任一项所述的重组抗体或抗体片段。

例如，Th2-介导的免疫疾病可以通过使用有效量的针对人或动物的重组抗体或抗体片段的方法来治疗，并且 Th2-介导的免疫疾病的诊断可以通过让重组抗体或抗体片段与待测样品相接触来进行。

(46) 一种对于血癌的诊断剂或治疗剂，包括作为活性成分的如 (1) - (21) 和 (27) 到 (39) 中的任一项所述的重组抗体或抗体片段。

例如，血癌可以通过使用有效量的针对人或动物的重组抗体或抗体片段的方法来治疗，并且血癌也可以通过使用重组抗体或抗体片段与待测样品的接触来进行诊断。

(47) 如 (46) 所述的治疗和诊断剂，其中所述血癌是白血病。

在本发明中，Th2-介导的免疫疾病的例子包括急性或慢性的导气管超敏反应或支气管哮喘，特应性皮肤病包括特应性皮炎、过敏性鼻炎、花粉病等。

在本发明中，癌症的例子包括血癌，且尤其是白血病。

可以应用依据本发明的任何重组抗体或抗体片段（下文称为“本发明的抗体”），只要它可以特异地与人 CCR4 的胞外结构域反应。一个优选的抗体是一个可以特异地与在 SEQ ID NO: 17 中所示的氨基酸序列中的包括第 1-39 位，第 98-112 位，第 176-206 位或第 271-284 位作用的抗体。更优选的抗体是包含 H 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3，其具有的氨基酸序列分别表示在 SEQ ID No: 5, 6 和 7 中，且包含 L 链 V 区的 CDR1, CDR2 和 CDR3，其具有的氨基酸序列分别表示在 SEQ ID No: 8, 9 和 10 中；且一个抗体包括一个 H 链 V 区，具有在 SEQ ID No: 15 中所示的氨基酸序列的第 20-138 位氨基酸，且一个 L

链 V 区, 具有在 SEQ ID No: 16 中所示的氨基酸序列的第 20-132 位的氨基酸。其中有一个或多个氨基酸缺失, 增加, 替换和/或在这些氨基酸序列中有插入、且与 CCR4 特异性作用的抗体和抗体片段也在本发明的范围内。

本发明中, 在氨基酸序列中有一个或多个氨基酸缺失, 替换, 插入或增加是指在该氨基酸序列中的一个或多个位点上一个或多个氨基酸缺失, 替换, 插入和/或插入。缺失, 替换, 插入和/或增加可以是在同一个氨基酸序列中同时发生。同时氨基酸残基的替换, 插入或增加可以是天然的或非天然的。天然氨基酸残基的例子包括 L-丙氨酸, L-天门冬酰胺, L-天冬氨酸, L-谷氨酰胺, L-谷氨酸, 甘氨酸, L-组氨酸, L-异亮氨酸, L-亮氨酸, L-赖氨酸, L-甲硫氨酸, L-苯丙氨酸, L-脯氨酸, L-丝氨酸, L-苏氨酸, L-色氨酸, L-酪氨酸, L-缬氨酸, L-半胱氨酸等。

下文说明的是氨基酸残基互相替换的例子。同一组的氨基酸残基可以互相替换。

A 组:

亮氨酸, 异亮氨酸, 正亮氨酸, 缬氨酸, 正缬氨酸, 丙氨酸, 2-氨基丁酸; 甲硫氨酸, O-甲基丝氨酸, t-丁基甘氨酸, t-丁基丙氨酸, 环己烷丙氨酸;

B 组:

天冬氨酸, 谷氨酸, 异天冬氨酸, 异谷氨酸, 2-氨基己二酸, 2-氨基辛二酸;

C 组:

天门冬酰胺, 谷氨酰胺;

D 组:

赖氨酸, 精氨酸, 鸟氨酸, 2,4-二氨基丁酸, 2,3-二氨基丙酸;

E 组:

脯氨酸, 3-羟基脯氨酸, 4-羟基脯氨酸;

F 组:

丝氨酸, 苏氨酸, 高丝氨酸;

组 G:

苯丙氨酸，酪氨酸。

本发明抗体的例子中包括如以下所述的人源化抗体，人抗体和抗体片段。

人源化抗体的例子包括人嵌合抗体和人的 CDR-移植抗体。

人嵌合抗体是指包含有非人动物的抗体 H 链 V 区（下文也称为“VH”）和抗体 L 链 V 区（下文也称为“LH”），人抗体 H 链 C 区（下文也称为“CH”）和人抗体的 L 链 C 区（下文也称为“CL”）的抗体。非人动物可以是小鼠，大鼠，仓鼠，兔子和其它可以制备杂交瘤的动物中的任一种。

本发明所述的人嵌合抗体可以通过从可以产生与 CCR4 特异反应的单克隆抗体的杂交瘤细胞中获得编码 VH 和 VL 的 cDNA 来制备，将 cDNA 插入到含有编码人抗体 CH 和人抗体 CL 的基因的动物细胞表达载体中以便构建人嵌合抗体表达载体，且将该载体导入动物细胞来表达抗体。

任何人嵌合抗体的 CH 均可用，只要其属于人免疫球蛋白（下文称为“hIg”），但优选的是那些 hIgG 类，且任何一种属于 hIgG 的亚类，例如 hIgG1，hIgG2，hIgG3 和 hIgG4 均可使用。同时可以使用任何人嵌合抗体的 CL，只要其属于 hIg，且可以使用 κ 类或 λ 类的抗体。

抗-CCR4 的嵌合抗体的例子包括 KM2760，其中抗体的 VH 包括的氨基酸序列在 SEQ ID No: 15 中所示的氨基酸序列中的第 20-138 位，抗体的 CH 包括 hIgG1 亚类的氨基酸序列，抗体的 VL 包括 SEQ ID No: 16 中所示的氨基酸序列中的第 20-132 位的氨基酸序列，且抗体的 CL 具有人抗体 κ 类的氨基酸序列。

人 CDR-移植抗体是一种抗体，其中来自于非人动物的抗体的 VH 和 VL 的 CDR 氨基酸序列被移植于人抗体的 VH 和 VL 的相应位置。

本发明所述的人 CDR-移植抗体可以通过移植一个与 CCR4 特异作用的非人动物抗体的 CDR 序列到一个可选择的人抗体的 VH 和 VL 的 CDR 序列中，从而构建一个编码所得 V 区的 cDNA，将该 cDNA 插入到一个具有编码人抗体 CH 和人抗体 CL 基因的动物细胞表达载体，从而构建了一个人 CDR-移植抗体表达载体，然后将此表达载体导入动物细胞来表达该抗体。

任何人 CDR-移植抗体的 CH 均可用, 只要其属于 hIg, 但优选的是那些 hIgG 类, 且任何一种属于 hIgG 亚类的, 例如 hIgG1, hIgG2, hIgG3 和 hIgG4 均可使用。同时可以使用任何人 CDR-移植抗体的 CL, 只要其属于 hIg, 且可以使用那些 κ 类或 λ 类。

起初, 人抗体是一个自然存在于人体的抗体, 但它也包括从人噬菌体抗体库中和生产人抗体的转基因动物中得到的抗体, 制备以最近在基因工程、细胞工程和发育工程技术上的进步为基础。

可以得到存在于人体中的抗体, 例如, 通过分离人外周血淋巴细胞, 通过用 EB 病毒或其它感染使其永生, 接着通过克隆, 培养产生抗体的淋巴细胞, 且从培养基上清中纯化抗体。

人抗体库是指通过把从人 B 细胞制备的抗体基因插入到噬菌体基因中, 从而将诸如 Fab, scFv 等的抗体片段表达于噬菌体表面的文库。表达一个具有所希望的抗原结合活性的抗体片段的噬菌体可以通过其与抗原固定化介质的结合活性作为指标来从文库中回收。通过基因工程技术, 抗体片段也可以进一步转变为含有两个完整 H 链和两个完整 L 链的人抗体分子。

产生人抗体的转基因动物是在其细胞中导入人抗体基因的动物。具体而言, 产生人抗体的转基因动物可以通过导入人抗体基因到鼠 ES 细胞来制备, 接种 ES 细胞于其它小鼠的早期胚胎中, 且发育成一个动物。人抗体也可以通过获得产生人抗体的杂交瘤来生产和积累, 按照杂交瘤的制备方法一般在非人的哺乳动物中制备杂交瘤, 然后培养杂交瘤, 在培养基上清中得到人抗体。

抗体片段的例子包括 Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, 包含 CDR 的肽, 等等。

Fab 是一个分子量大约为 50,000 的且具有抗原结合活性的抗体片段, 其中 H 链 N 端的侧链中的大约一半和整个 L 链通过一个二硫键结合在一起, 这些链属于用一种蛋白酶, 木瓜蛋白酶处理 IgG 所获片段之列 (在 H 链第 224 位的氨基酸残基处切开)。

本发明所述的 Fab 可以通过用木瓜蛋白酶处理与 CCR4 特异反应的抗体来制备。Fab 片段也可以通过将编码抗体 Fab 的 DNA 插入到原核生物表达载体中或真核生物表达载体中, 并将该载体导入到原核或

真核生物中表达 Fab。

$F(ab')_2$ 是一个分子量大约为 100,000、具有抗原结合活性的抗体片段，其比经由铰链区的二硫键结合的 Fab 稍大一些，其属于用一种蛋白酶，即木瓜蛋白酶处理 IgG 所获片断之列（在 H 链第 234 位的氨基酸残基处切开）。

本发明的 $F(ab')_2$ 可以通过用木瓜蛋白酶处理与 CCR4 特异反应的抗体来制备。 $F(ab')_2$ 片段也可以通过经由硫醚键或二硫键结合以下描述的 Fab' 得到。

Fab' 是一个分子量大约为 50,000 的、且具有抗原结合活性的抗体片段，其通过切开 $F(ab')_2$ 铰链区的二硫键制备。

本发明的 Fab' 可以通过用还原性药剂，二硫苏糖醇处理可以与 CCR4 特异作用的 $F(ab')_2$ 来制备。Fab' 片段也可以通过将编码抗体 Fab' 的 DNA 插入到原核生物表达载体中或真核生物表达载体，并将该载体转入到原核或真核生物中表达 Fab'。

scFv 是一个 VH-P-VL 或 VL-P-VH 的多肽，其中一个 VH 链与一个 VL 链通过合适的多肽接头（下文中称为“P”）连在一起。在本发明中所述的 scFv 的 VH 和 VL 可以是与 CCR4 作用的本发明的任一抗体，如人源化抗体或人抗体。

本发明的 scFv 可以通过得到编码可以与 CCR4 特异作用的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 得到，构建编码 scFv 的 DNA，通过将该 DNA 插入到原核生物表达载体中或真核生物表达载体，并将该载体导入到原核或真核生物中表达 scFv。

dsFv 可以通过将多肽用半胱氨酸残基之间的二硫键结合在一起，其中每一个 VH 和 VL 中的一个氨基酸残基被一个半胱氨酸残基所替代。。用半胱氨酸替代的氨基酸残基的选择是依据根据由 Reiter 等(Protein Engineering, 7: 697 (1994)) 所证明的方法预测的抗体三维结构来进行。对于本发明 dsFv 中包含的 VH 和 VL，可以应用本发明中可以特异地与 CCR4 作用的任一抗体，例如人源化抗体或人抗体。

本发明的 dsFv 可以通过得到编码可以与 CCR4 特异作用的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 得到，构建编码的 dsFv 的 DNA，通过将该 DNA 插入到原核生物表达载体中或真核生物表达载体，并将该载体转入到

原核或真核生物中表达 dsFv。

包含 CDR 的肽是通过包含 H 链的至少一个区和 L 链 CDR 来制备。多个 CDR 可以直接或经由一合适的肽接头结合在一起。

本发明所述的包含 CDR 的肽可以通过得到编码可以与 CCR4 特异作用的抗体的 VH 和 VL 的 cDNA 得到，构建编码 CDR 的 DNA，通过将该 DNA 插入到原核生物表达载体中或真核生物表达载体，并将该载体转入到原核或真核生物中表达该肽。

包含 CDR 的肽也可以通过化学合成方法制备，例如 Fmoc 法（9-芴甲氧羰基法），tBoc 法（叔-丁氧基羰基法）等制备。

本发明的抗体包括抗体衍生物，其中用放射性同位素、蛋白或药剂通过化学或基因工程方法与可以特异地与 CCR4 作用的任一抗体如人源化抗体，人抗体或抗体片段结合。

本发明的抗体衍生物可以通过化学结合放射性同位素、蛋白或药剂于特异地与 CCR4 作用的抗体或抗体片段的 H 链或 C 链的 N-端或 C 端侧链上，或结合于抗体或抗体片段的合适取代基团或侧链上，或者结合于抗体或抗体片段的糖链上（Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)）。

同样地，其可以通过基因工程方法制备，使编码与 CCR4 特异作用的抗体或抗体片段的 DNA 与其它编码待结合蛋白的 DNA 进行连接，插入该 DNA 于表达载体中，然后将表达载体导入宿主细胞。

放射性同位素的例子包括 ^{131}I 、 ^{125}I 等，它们可以与抗体通过氯胺 T 等方法偶合。

对于药剂，优选低分子量的药剂。例子包括抗癌药剂如烷基化药剂（如氮芥，环磷酰胺等），代谢拮抗剂（如，5-氟尿嘧啶，氨甲蝶呤，等）抗生素（如，道诺霉素，博莱霉素，丝裂霉素 C，道诺红霉素，阿霉素，等），植物碱（如，长春花新碱，长春花碱，去乙酰长春酰胺，等），激素药物（如，三苯氧胺，地塞米松等）等。（Clinical Oncology, edited by Japanese Society of Clinical Oncology, published by Cancer and Chemotherapy (1996)）；抗-发炎药剂如类固醇药剂（如，皮质醇，强的松，等），非类固醇药物（如，阿斯匹林，吲哚美辛等，），免疫调节剂（如，硫代苹果酸亚金，青霉胺，等）免疫抑制剂（如环磷酰胺，

咪唑硫嘌呤, 等), 抗组胺剂 (如氯苯吡胺, 铁线莲亭, 等), 和其它类似物 (Inflammation and Anti-inflammatory Therapy, Ishiyaku Shuppan(1982)) 等等。对于将道诺霉素结合到抗体上的方法包括用戊二醛将道诺霉素与抗体的氨基结合的方法, 用水溶性的碳二酰亚胺等将道诺霉素的氨基与抗体的羧基接合的方法,

对于蛋白, 优选的是作为蛋白的可以激活免疫细胞的细胞因子。例子包括人白细胞介素 2 (下文称为 “hIL-2”), 人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (下文称为 “hGM-CSF”), 人巨噬细胞集落刺激因子 (下文称为 “hM-CSF”), 人白细胞介素 12 (下文称为 “hIL-12”), 等等。同时为了直接抑制癌细胞, 可以使用如蓖麻毒蛋白, 白喉类毒素等毒素。例如, 可以产生与蛋白融合的抗体, 方法是可以通过将编码该抗体或抗体片段的 cDNA 与其它编码蛋白的 cDNA 连接, 构建编码融合抗体的 DNA, 插入该 DNA 于原核生物或真核生物表达载体中, 然后将其导入原核或真核生物中表达融合抗体。

制造与 CCR4 特异作用且在 H 链和 L 链 V 区具有新的氨基酸序列的人嵌合抗体的方法以以下的实施例为基础描述。

1. 从杂交瘤中制备抗-CCR4 的单克隆抗体

(1) 制备抗原

将含有编码 CCR4 的 cDNA 表达载体导入宿主细胞如大肠杆菌、酵母、昆虫细胞、动物细胞等, 得到重组 CCR4 蛋白。也可以是表达 CCR4 的肿瘤细胞中, 通过其得到重组 CCR4 蛋白, 从细胞中纯化的 CCR4 蛋白或合成的具有 CCR4 部分序列的多肽可以作为抗原。

选择具有大约 5-30 个残基的部分蛋白序列作为抗原用的部分肽。为了得到识别具有未修饰的天然结构蛋白的抗体, 有必要选择在蛋白三级结构表面的部分序列作为抗原肽。在蛋白三级结构表面的部分可以通过用商业上已有的蛋白序列分析软件如 Genetyx Mac 等预测一段具有高亲水性的部分序列来估计。一般而言, 具有低亲水性的部分绝大多数在蛋白三级结构的内部, 而高亲水的部分绝大多数在蛋白的表面。在很多例子中, 一个蛋白的 N 端和 C 端也在蛋白的表面。但是以此方法选择的部分肽段并不总是具有得到靶抗体的抗原的作用。

为了使部分肽段交联于一个蛋白上, 在部分肽段的末端区域加入

半胱氨酸。当选择一蛋白的内部序列时，如果必要，那么肽段 N 端和 C 端分别被乙酰化和酰胺化。

部分肽段可以通过常规的液相或固相肽合成方法、固液结合方法或修改的这些方法合成 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1, edited by Erhard Gross and Johannes Meinhofer, Academic Press (1979), vol. 2 (1980), vol. 3 (1981); Fundamentals and Experiments on Peptide Synthesis, Nobuo Izumiya, Maruzen (1985); Development of Drugs-Second Series, vol. 14, Peptide Synthesis, edited by Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten (1991); International Journal of Peptide Protein Research, 35: 161 (1990)。

也可以使用自动多肽合成仪。用适宜的侧链被保护的氨基酸如 N α -Fmoc-氨基酸, N α -Boc-氨基酸等在可以买到的肽链合成仪上, 按照每一个合成仪的合成程序可以合成多肽, 如由 Shimadzu 公司制造的多肽合成仪, 由 Applied Biosystems, Inc. USA 公司 (下文称为“ABI”) 制造的多肽合成仪, 由 Advanced ChemTech Inc. USA 公司 (下文称为“ACT”) 制造的多肽合成仪等等。

作为原料的被保护氨基酸和载体树脂可以从 ABI, Shimadzu, Kokusan Kagaku, Nova Biochem, Watanabe Kagaku, ACT 等公司的多肽部门购买。作为原料的被保护氨基酸、被保护有机酸和被保护有机胺也可以通过已知的合成方法或这些方法的修改方法来合成 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1, edited by Erhard Gross and Johannes Meinhofer, Academic Press (1979), vol. 2 (1980), vol. 3 (1981); Fundamentals and Experiments on Peptide Synthesis, Nobuo Izumiya, Maruzen (1985); Development of Drugs-Second Series, vol. 14, Peptide Synthesis, edited by Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten (1991); International Journal of Peptide Protein Research, 35: 161 (1990)。

(2) 免疫动物和制备产生抗体的细胞

只要可以制备杂交瘤的任何动物包括小鼠、大鼠、仓鼠、兔子等等可以用于免疫。以下描述的是用小鼠和大鼠的实施例。

用上述 1 (1) 中制备的抗原免疫年龄在 3 到 20 周的小鼠或大鼠,

从该动物的脾脏、淋巴结或外周血中收集抗体产生细胞。免疫的过程是通过对动物皮下、静脉或腹腔内多次施用与适当的佐剂配制在一起的抗原来完成的。佐剂的例子包括完全弗氏佐剂、氢氧化铝凝胶和百日咳疫苗的混合物等等。当抗原是部分肽链时，通过与载体蛋白如BSA（小牛血清白蛋白）、KLH（匙孔血蓝蛋白）或其它蛋白与其形成偶合物用于抗原。每次施用3-7天后，从动物的眼底或尾静脉取血样，检测与所用抗原，即CCR4，的作用活性，例如通过酶免疫测定法（酶联免疫分析（ELISA），由Igaku Shoin（1976）出版，然后用在其血清中显示足够的抗体滴度的小鼠或大鼠作为抗体产生细胞的供应来源。在最后一次使用抗原后的第3天到第7天，从免疫的小鼠或大鼠中提取脾脏，按照已知的方法进行脾细胞与骨髓瘤细胞的融合（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)。

（3）制备骨髓瘤细胞

只要其在体外可以增殖，可以使用任何骨髓瘤细胞。例子包括从小鼠中建立的细胞系，例如8-氮鸟嘌呤-抗性鼠（BALB/c）骨髓瘤细胞系P3-X63Ag8-U1（P3-U1）（Europ. J. Immunol, 6:511(1976)），SP2/0-Ag14（SP-2）（Nature,276:269(1978)，P3-X63-Ag8653（653）（J. Immunol. , 123: 1548（1979）），P3-X63-Ag8（X63）（Nature, 256: 495（1975））等等。这些细胞系的培养和次代培养按照已知的方法进行（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)）在细胞融合时细胞的浓度应至少为 2×10^7 。

（4）细胞融合

洗涤以上获得的抗体产生细胞，加入细胞聚集媒介物如聚乙二醇-1000（PEG-1000）等使细胞融合，细胞悬浮于培养基中。对于细胞的洗涤，可以用MEM培养基、PBS（1.83g 磷酸氢二钠，0.21g 磷酸二氢钾，7.65g 氯化钠，1升蒸馏水，pH7.2）。为了选择性得到靶融合细胞，可以用HAT培养基{正常培养基（通过加入谷氨酰胺（1.5mM），2—巯基乙醇（ 5×10^{-5} M），庆大霉素（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）和胎牛血清（FCS）（10%，由CSL制造）到RPHT-1640培养基中，另外补加次黄嘌呤（ 10^{-4} M），胸腺嘧啶核苷（ 1.5×10^{-3} M）和氨基蝶呤（ 4×10^{-7} M）}作为悬浮融合细胞的培养基。

培养后，收集培养基的上清部分取样，且通过酶免疫测定法选择与抗原蛋白作用而不与非抗原蛋白作用的样品。此后通过有限稀释方法进行克隆，选择显示出稳定的高抗体滴度的杂交瘤作为产生单克隆抗体的杂交瘤。

(5) 选择产生抗-CCR4 的单克隆抗体的杂交瘤

通过以下描述的、按照（抗体-实验操作指南，冷泉港实验室（1988）等所述的方法进行分析来选择产生抗-CRR4 单克隆抗体的杂交瘤。按照此分析，在包含于能产生以下描述的抗-CCR4 人嵌合抗体或抗体片段的转化子的培养基上清中的抗-CCR4 人抗体或所有纯化的抗-CCR4 抗体的结合活性可以测量。

酶免疫测定法：

将抗原包被于 96 孔的 ELISA 板上。用杂交瘤培养基上清或由以上方法纯化的抗体作为一抗反应。

一抗作用后，洗涤酶标板，且加入二抗。

二抗可以通过用生物素、酶、化学发光物质、放射性化合物等标记能够识别一抗免疫球蛋白的抗体来得到。如果用鼠制备杂交瘤，可以识别鼠免疫球蛋白的抗体可以用作二抗。

反应后，进行适合于用于标记二抗的物质的反应，来选择可以产生与抗原特异作用的单克隆抗体的杂交瘤。

杂交瘤的例子包括杂交瘤 KM2160。

(6) 纯化单克隆抗体

由上面的 1（4）得到的产生抗-CCR4 单克隆抗体的杂交瘤细胞通过与降植烷一起腹腔内注射至 8-周龄到 10-周龄的小鼠或裸鼠中（0.5ml 2,6,10,14-四甲基十五烷（降植烷）一起进行腹腔内注射，然后饲养 2 周），杂交瘤的剂量为 2×10^7 到 5×10^6 个细胞/动物。杂交瘤在 10-21 天中引起腹水肿瘤。从小鼠或裸鼠中收集腹水，离心，用 40%-50% 的饱和硫酸铵盐析或辛酸沉淀，然后通过 DEAE-Sepharose 柱、蛋白 A 柱或 Cellulofine GSL 2000（由 Seikagaku 公司制造）层析，收集 IgG 或 IgM 部分作为纯化的单克隆抗体。

纯化的单克隆抗体的亚类可以通过使用小鼠单克隆抗体分类试剂盒或大鼠单克隆抗体分类试剂盒来确定。蛋白的量可以通过劳里法

(Lowry 法) 测定或者在 280nm 的吸光度确定。

抗体的亚类表示同一类中的同型体, 在小鼠中如 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3, 人中如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

小鼠中的 IgG2a、IgG2b、IgG3 和 人 中 IgG1、IgG3 具有相对高的细胞毒性, 例如 CDC 活性、ADCC 活性等细胞毒性, 所以它们可以用于医疗中。

2. 制备人源化抗体

(1) 构建人源化抗体表达载体

人源化抗体表达载体是用于动物细胞的表达载体, 其中已经插入了编码人抗体的 H 链 C 区和 L 链 C 区的基因, 是通过克隆人抗体的每一个 H 链 C 区和 L 链 C 区至动物细胞的表达载体中来构建的。

人抗体的 C 区可以是任何人抗体的 H 链 C 区和 L 链 C 区。例子包括人抗体 H 链的属于 IgG1 亚类的 C 区 (下文称为 “hC γ 1”), 人抗体 L 链的属于 κ 类的 C 区 (下文称为 “hC κ ”), 等等。对于编码人抗体的 H 链 C 区和 L 链 C 区的基因, 可以使用包含外显子和内含子的人染色体 DNA 或 cDNA。

对于动物细胞的表达载体, 可以使用任何表达载体, 只要在其中可以插入并可以表达人抗体的 C 区。例子包括 pAGE107 (Cytotechnology, 3: 133(1990)), pAGE103 (J. Biochem., 101:1307(1987)), pHSG274 (Gene, 27:223 (1984)), pKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527(1981)), pSGI β d2-4 (Cytotechnology, 4: 173 (1990)), 等等。用于动物细胞表达载体的启动子和增强子包括 SV40 的早期启动子和增强子 (J. Biochem., 101:1307(1987)), 莫洛尼鼠白血病病毒 LTR 启动子和增强子 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 149:960(1987)), 免疫球蛋白 H 链启动子 (Cell, 41: 479 (1985)) 和增强子 (Cell, 33: 717 (1983)), 等等。

人源化抗体表达载体可以是以下所述的任一种, 其中编码抗体 H 链与编码抗体 L 链的基因分别在不同的载体上, 或者两个基因在同一载体上 (串联型)。考虑到构建人源化抗体基因表达载体的易行性, 导入动物细胞的易行性, 以及抗体 H 链与 L 链在动物细胞中的表达量的平衡, 更优选串联型人源化抗体表达载体 (J. Immunol. Methods, 167:

271(1994))。串联型人源化抗体表达载体的例子包括 pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 (HYBRIDOMA, 17:559(1998)) 等等。

构建的人源化抗体表达载体可以用来在动物细胞中表达人嵌合抗体和人 CDR-移植抗体。

(2) 制备编码来自非人动物抗体 V 区的 cDNA 和氨基酸序列分析

制备编码来自非人动物如鼠抗体的 H 链和 L 链 V 区的 cDNA, 其以如下所述进行。

从产生鼠抗体或类似物的杂交瘤细胞中提取 mRNA 来合成 cDNA。合成的 cDNA 插入到噬菌体、质粒等载体中, 制备 cDNA 文库。且用鼠抗体的 C 区或 V 区的部分序列作为探针, 从文库中分离每一个包含有编码 H 链 V 区的 cDNA 的重组噬菌体或重组质粒, 和每一个包含有编码 L 链 V 区的 cDNA 的重组噬菌体或重组质粒。测定在重组噬菌体或重组质粒中有重要意义的鼠抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的全长核苷酸序列。且从该核苷酸序列中推断出全长 H 链 V 区和 L 链 V 区的氨基酸序列。

非人动物可以是包括小鼠、大鼠、仓鼠、兔子等只要可以制备杂交瘤的任何动物。

从杂交瘤细胞中制备总 RNA 的方法的实例包括硫氰酸胍-氯化铯法(Methods in Enzymol. ,154:3(1987))等等。从总 RNA 中制备 mRNA 的方法的实例包括 oligo (dT) 固定化纤维素柱法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)) 等等。也可以使用从杂交瘤细胞中制备 mRNA 的试剂盒, 包括 Fast Track mRNA 分离试剂盒 (Invitrogen 制造), Quick Prep mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 制造) 等等。

合成 cDNA 和制备 cDNA 库的方法实例包括已知的方法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34); 也可以使用通过商业途径可以获得的试剂盒的方法, 例如用于 cDNA 的合成和质粒克隆的 Super Script™ 质粒系统 (GIBCO BRL 制造), ZAP-cDNA 试剂盒 (Stratagene 制造) 等等。

将从杂交瘤细胞中提取的 mRNA 作为模板合成的 cDNA 插入其中、用于构建 cDNA 文库的载体可以是任何载体，只要是可插入 cDNA 的载体。例子包括 ZAP 表达载体 (Strategies, 5: 58 (1992)), pBluescript II SK (+) (Nucleic Acid Research, 17: 9494 (1989)), λ zapII (Stratagene 制造), λ gt10 和 λ gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49(1985)), Lambda BlueMid (Clontech 制造), λ Excell 和 pT7T3 18U (Pharmacia 制造), pcD2 (Mol. Cell.Biol.,3:280(1983)), pUC18(Gene,33:103(1985)),等等。

由噬菌体或质粒构建的 cDNA 库可以导入任何大肠杆菌中，只要 cDNA 文库可以导入、表达和保持稳定。例子包括 XL1-Blue MRF' (Strategies, 5: 81 (1992)), C600 (Genetics, 39: 440 (1954)), Y1088 和 Y1090 (Science, 222: 778 (1983)), NM522 (J.Mol.Biol.,166:1(1983)), K802 (J.Mol.Biol.,16:118 (1966)), JM105(Gene, 38:275 (1985)), 等等。

可以使用放射性同位素或荧光-标记的探针集落杂交或噬菌体斑点杂交的方法在 cDNA 库中选择编码来源于非人动物抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 克隆(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)。编码 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 也可以通过制备引物，以及使用从 mRNA 制备的 cDNA 或 cDNA 文库为模板，用聚合酶链式反应(下文称为“PCR”; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York(1989), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34);)来制备。

cDNA 的核苷酸序列可以通过以下方法确定，用合适的限制酶和类似物消化以上方法选择的 cDNA，克隆该片段到如 pBluescrip SK (-) (Stratagene 制造)等的质粒中，进行常规的核苷酸分析方法，如 Sanger, F. et al. 的双脱氧法 (Proc.Natl.Acad..Sci.USA, 74:5463(1977)) 等，然后用如 A. L. F. 的 DNA 测序仪 (Pharmacia 制造) 等自动核苷酸序列分析仪分析序列。

得到的 cDNA 是否编码包含分泌信号序列的抗体全长的 H 链 V 区和 L 链 V 区氨基酸序列可以通过从测定的核苷酸序列预计出的全长的

H 链 V 区和 L 链 V 区的氨基酸序列来确认, 且通过与已知抗体的全长的 H 链 V 区和 L 链 V 区氨基酸序列进行比较分析来确认 (Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991))。分泌信号序列和 N-端氨基酸序列的长度可以通过比较包含分泌信号序列的、具全长的 H 链 V 区和 L 链 V 区氨基酸序列的抗体与已知抗体的全长的 H 链 V 区和 L 链 V 区氨基酸序列来推定, (Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)), 它们属于的亚类也可以知道。此外, 可以通过比较得到的氨基酸序列与已知抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区氨基酸序列来发现 H 链 V 区和 L 链 V 区每一个 CDR 的氨基酸序列 (Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991))。

此外, 可以通过使用全长的 H 链 V 区和 L 链 V 区氨基酸序列在任何数据库如 SWISS-PORT, PIR-Protein 或其它数据库中, 按照 BLAST 法(J. Mol, Biol., 215: 403 (1990)或其它类似方法来进行同源性搜索, 检查确定该序列的新颖性。

(3) 构建人嵌合抗体表达载体

人嵌合抗体表达载体可以通过在上面 2 (1) 中描述的人源化抗体表达载体中克隆编码 H 链 V 区和 L 链 V 区的非人动物的抗体 cDNA 至编码 H 链 C 区和 L 链 C 区人抗体基因的上游区来构建。例如, 每一个编码源于非人动物抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 与合成包括源于非人动物抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 3' 端核苷酸序列和人抗体的 H 链 C 区和 L 链 C 区的 5' 端核苷酸序列的 DNA 相连, 且在两个末端含有合适的限制酶识别序列, 并且克隆每一个 cDNA, 以便将在上面 2 (1) 中描述的人源化抗体表达载体中的编码 H 链 C 区和 L 链 C 区的基因表达在上游, 由此构建了人嵌合抗体表达载体。源于非人动物的抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 也通过使用合成的在两端具有合适的限制酶识别序列的 DNA, 用 PCR 方法来扩增, 并且每一个可以克隆至上面 2 (1) 所描述的人源化抗体表达载体中。

(4) 构建编码人 CDR-移植抗体的 V 区的 cDNA

编码人 CDR-移植抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 可以通过以下的方法获得。首先, 选择欲将源于非人动物抗体的抗体中的 H 链

V 区和 L 链 V 区的 CDR 中氨基酸序列移植到其上的人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 的氨基酸序列。可以使用任一人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 氨基酸序列, 只要它们来自人。例子包括在如蛋白质数据库等数据库中已经登记的人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 氨基酸序列, 并且在人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 亚类中所共有的氨基酸序列 (Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)) 等等。为了产生具有强活性的人 CDR-移植抗体, 优选的是选择与源于非人动物的目的抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 氨基酸序列具有高同源性(至少 60% 或更多)的氨基酸序列。然后, 源于非人动物抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 CDR 氨基酸序列移植到选择的人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 氨基酸序列上, 来设计人 CDR-移植抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的氨基酸序列。根据抗体基因中的核苷酸序列的密码子的偏爱性 (Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)), 将设计的氨基酸序列转变成 DNA 序列, 这样就设计了编码人 CDR-移植抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的氨基酸序列的 DNA 序列。合成几种大约 100 个核苷酸长度的 DNA 序列, 用它们进行 PCR 反应。在这种情况下, 考虑到 PCR 反应的效率与可以合成的 DNA 的长度, 优选在每一个 H 链和 L 链中设计合成 6 个 DNA 片段。

此外它们可以很容易地通过在合成的 DNA 的两个末端的 5' 端引入合适的限制酶识别序列, 克隆到上面的 1 (2) 所构建的人源化抗体表达载体中。PCR 后, 扩增产物克隆至如 pBluescript SK (-) (Stratagene 制造) 等质粒中, 核苷酸序列按照上面 2(2) 所描述的方法进行测定, 就得到一个具有编码设计的人 CDR-移植抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 DNA 序列。

(5) 修饰人 CDR-移植抗体的 V 区的氨基酸序列

已经知道当人 CDR-移植抗体是通过简单地仅将源于非人动物抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 CDR 区移植到人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 中, 其抗原结合活性低于起始的源于非人动物的抗体 (BIO/TECHNOLOGY, 9: 266(1991))。所以, 根据情理, 考虑到不仅 CDR 中而且 FR 中的几个氨基酸残基直接或间接地与存在于源于非人动物

的起始抗体中的 H 链 V 区和 L 链 V 区的抗原结合活性相关,且它们被变成人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区中不同的 FR 中的不同的氨基酸残基。为了解决此问题,在人 CDR-移植抗体中,在人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 FR 的氨基酸序列中,直接与抗原结合的氨基酸残基,或者通过与在 CDR 上的氨基酸残基相互作用或通过保持抗体的三维结构的不直接与抗原结合的氨基酸残基可以被识别和修饰原始的非人动物抗体中发现的氨基酸残基,因此以增加已经减少了的抗原结合活性 (BIO/TECHNOLOGY,9:266(1991))。在生产人 CDR-移植抗体中,怎样有效的识别 FR 中的有关抗原结合活性的氨基酸残基是最重要的,所以要构建抗体三维结构,并使用 X 射线晶体照相术(J.Mol.Biol.,112:535 (1977))、计算机模拟(Protein Engineering,7:1501(1994))等等分析抗体的三维结构。虽然抗体三维结构信息在生产人 CDR-移植抗体时是有用的,但是还没有在能产生人 CDR-移植抗体的方法中建立应用于任何抗体方法。所以,目前必需有多种尝试,例如,产生一种抗体的多种修饰抗体,检测每一修饰抗体和抗体结合活性的关系。

在人抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区中选定的 FR 的氨基酸序列的修饰可以按照上面 2 (4) 描述的 PCR 的方法使用多种合成的 DNA 来完成。关于通过 PCR 获得的扩增产物,根据上面 2 (2) 描述的方法确定核苷酸序列,以证实是否已经进行了目的修饰。

(6) 人 CDR-移植抗体表达载体的构建

如上面 2 (1) 描述的人源化抗体表达载体中,人 CDR-移植抗体表达载体能通过克隆编码在上面 2 (4) 和 2 (5) 中构建的人 CDR-移植抗体 H 链 V 区和 L 链 V 区的 cDNA 到编码人抗体的 H 链 C 区和 L 链 C 区的基因的上游而构建。

例如,在用于构建上面 2 (4) 和 2 (5) 中的人 CDR-移植抗体 H 链 V 区和 L 链 V 区中使用的合成 DNA 中,在合成 DNA 的 5' 两端引入合适的限制酶识别位点,进行克隆,以便可以在如上面 2 (1) 中所述的人源化抗体表达载体中在编码人抗体的 H 链 C 区和 L 链 C 区的基因上游以合适的形式表达它们。

(7) 人源化抗体的瞬间表达

为了有效的评价产生的各种人源化抗体的抗原结合活性,可以通

过使用如 2 (3) 和 2 (6) 中所述的人源化抗体表达载体或修饰后的表达载体瞬间表达人源化抗体。只要宿主细胞可以表达人源化抗体, 任何细胞都可以用于宿主细胞。一般地, 由于其高表达量, 使用 COS-7 细胞 (ATCC CRL1651) (Methods in Nucleic Aids Res., CRC Press, p. 283 (1991))。导入表达载体至 COS-7 细胞的方法实例包括 DEAE-葡聚糖法 (Methods in Nucleic Aids Res. ,CRC Press, p. 283 (1991)), 和脂质转染法 (Proc. Natl. Acad.Sci. USA,84: 7413(1987)) 等。

当载体导入后, 在培养基上清中的人源化抗体的表达量和抗体结合活性可以通过酶免疫测定 (ELISA); Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)), 等等。

(8) 人源化抗体的稳定表达

稳定地产生人源化抗体的转化子可以通过将如上面 2 (3) 和 2 (6) 中描述的人源化抗体表达载体导入合适的宿主细胞得到。

导入表达载体于宿主细胞的方法实例包括电穿孔法 (Japanese Published Unexamined Patent Application No. 257891/90, Cytotechnology, 3: 133(1990)) 等。

任何细胞可以用作导入人源化抗体表达载体的宿主细胞, 只要它可以表达人源化抗体。实例包括鼠 SP2/0-Ag14 细胞(ATCC CRL1581), 鼠 P3X63-Ag8.653 细胞 (ATCC CRL1580), 二氢叶酸还原酶基因 (下文称为 “DHFR 基因”) 可用于检测的 CHO 细胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)), 大鼠 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 细胞 (ATCC CRL1662, 下文称为 “YB2/0 细胞”), 等等。

产生具有抗体-依赖的细胞-介导的细胞毒性的抗体的宿主细胞中优选的细胞是那些将岩藻糖添加到结合于抗体 Fc 区的 N-乙酰葡萄糖胺上的反应中具有低的酶活性或没有酶活性。

对于岩藻糖添加到结合于抗体 Fc 区的 N-乙酰葡萄糖胺上的反应中所用酶的实例包括: 与 α 1,6-键相关的酶, 例如 α 1,6-岩藻糖基转移酶; 与生物合成 GDP-岩藻糖相关的酶, 例如 GDP-甘露糖 4, 6-脱水酶, GDP- β -L-岩藻糖焦磷酸化酶, foco 激酶, 等等。因此, 通过将用作宿

主细胞的细胞接受人工突变所获细胞也可以用作宿主细胞，其中人工突变包括该酶基因的缺失或突变以降低或缺失该酶活性。

对于宿主细胞，只要重组抗体可以产生，任何细菌，酵母，动物细胞，昆虫细胞，植物细胞等均可作为宿主细胞。优选动物细胞，如包括 YB2/0 细胞，如 NS0 细胞和 SP2/0 细胞的鼠骨髓瘤细胞，如 CHO /dhfr 细胞和 CHO/DG44 细胞的中国仓鼠卵巢细胞，如 COS 细胞的猴细胞，如 Namalwa 细胞的人骨髓瘤细胞等等。

含有糖链结合于抗体 Fc 区的抗体具有高含量的 N-葡萄糖苷结合糖链，其中岩藻糖并不结合于 N-乙酰葡萄糖胺，该抗体可以通过使用宿主细胞得到。该抗体显示较源于非人动物的杂交瘤细胞的单克隆抗体高的对 CCR4-表达细胞的抗体-依赖细胞-介导的细胞毒性。

当导入表达载体以后，按照 Japanese Published Unexamined Patent Application No. 257891/90 的方法，通过在含有一种如 G418 硫酸盐（下文称为“G418”，由 Sigma 制造）等试剂的动物细胞培养基中培养，来选择稳定表达人源化抗体的转化子，动物细胞的培养基的例子包括 P RMI1640 培养基（Nissui Pharmaceutical 制造），GIT 培养基（Nissui Pharmaceutical 制造），EX-CELL302 培养基（JRH 制造），IMDM 培养基（GIBCO BRL 制造），Hybridoma-SFM 培养基（GIBCO BRL 制造），通过加入不同的如 FCS 等添加物于这些培养基中来制备使用的培养基。通过在培养基中培养选择出的转化子，人源化抗体可以产生并积累。在培养基上清中的人源化抗体表达量与抗原结合活性可以通过 ELISA 等方法测定。同时，在转化子中，按照 Japanese Published Unexamined Patent Application No. 257891/90 的方法人源化抗体的表达量可以通过使用 dhfr 扩增系统等来增加。

人源化抗体可以通过使用蛋白 A 柱子从转化子的培养基上清中纯化（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)）。可以使用任何其他的蛋白纯化传统方法。例如，人源化抗体可以通过联合使用凝胶过滤、离子交换层析、超滤等方法纯化。纯化的人源化抗体或抗体分子的 H 链或 L 链或整个抗体分子的分子量大小由聚丙烯酰胺凝胶电泳（下文称为“SD

S-PAGE”) [Nature, 227: 680(1970)], 蛋白印迹等方法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)) 确定。

(9) 评价人源化抗体的活性

纯化的人源化抗体的抗原结合活性与 CCR4-表达细胞系的结合活性可以通过 ELISA、免疫荧光方法 (Cancer Immuno Immunother. ,36: 373(1993)) 来确定。对抗原阳性的培养细胞系的细胞毒性可以通过测定 CDC 活性、ADCC 活性 (Cancer Immuno Immunother. ,36:373(1993)) 等方法来评价。

3. 用抗-CCR4 抗体检测和确定 CCR4 的方法

本发明涉及用本发明的抗体利用免疫学方法检测和确定 CCR4 或在表面表达 CCR4 的细胞的方法。

用本发明的抗体利用免疫学方法检测和确定 CCR4 或在表面表达 CCR4 的细胞的方法包括免疫荧光法, 酶联免疫分析 (ELISA), 放射免疫分析 (RIA), 免疫组织化学染色法如免疫细胞染色法、免疫组织染色法等等 (ABC 法, CSA 法等等), 和上述的酶免疫分析, 夹心 ELISA 法 (Monoclonal Antibody Experiment Manual (published by Kodansha Scientific, 1987), Second Series Biochemical Experiment Course, Vol. 5, Immunobiochemistry Research Method, published by Tokyo Kagaku Dojin (1986))。

免疫荧光法包括用本发明的抗体与独立的细胞、组织等反应, 然后用荧光物质如异硫氰酸荧光素 (FITC) 等标记的抗-免疫球蛋白抗体或结合片段与以上的反应物反应, 然后用流式细胞仪测定荧光物质。

酶联免疫分析 (ELISA) 包括用独立的细胞或其破碎液, 组织或其破碎液, 细胞培养基上清, 血清, 前尿液, 腹水液, 眼睛液体等等与本发明的抗体反应, 然后用如辣根过氧化物酶, 生物素等等标记的抗-免疫球蛋白的抗体或结合片段与以上的反应物反应, 然后用吸光计测定产物的产生颜色变化。

放射性标记的免疫分析 (RIA) 包括用独立的细胞或破碎液, 组织或其破碎液, 细胞培养基上清, 血清, 前尿液, 腹水液, 眼睛液体等

等与本发明的抗体反应，然后用放射性同位素标记的抗-免疫球蛋白抗体或结合片段与以上的反应物反应，然后用闪烁计数仪等测定放射性活性。

免疫细胞染色和免疫组织染色的方法包括用独立的细胞，组织或类似物与本发明的抗体反应，然后用荧光物质如异硫氰酸荧光素（FITC）等，酶如辣根过氧化物酶，生物素等标记的抗-免疫球蛋白抗体或结合片段与以上的反应物反应，然后用显微镜观察细胞、组织等。

夹心 ELISA 的方法包括将本发明所述抗体中具有不同表位的两个抗体之一吸附于板上；用荧光物如异硫氰酸荧光素（FITC）等，酶如辣根过氧化物酶，生物素等标记另一个抗体；在吸附抗体的板上与独立的细胞或破碎液，组织或其破碎液，细胞培养基上清，血清，前尿液，腹水液，眼睛液体等等反应，然后用另一个标记的抗体按照标记物的反应特性与其反应。

4. 诊断和治疗 Th2-介导的免疫疾病或癌症

由于本发明的人源化抗体可以特异地与表达于培养细胞系的 CCR4 结合且显示如 CDC 活性 ADCC 活性等细胞毒性，所以其可以在诊断和治疗 Th2-介导的疾病等有作用。同时由于在人源化抗体中源于人抗体的氨基酸序列的比例较其他非人动物抗体要高，其有望表现出在人体中强细胞毒性，但并没有免疫原性，且作用持久。

另外，由 IL-4，IL-5，IL-13 等细胞产生的 Th2 细胞因子可以通过施用本发明抗体于实验对象的细胞或组织中来抑制。

在本发明使用的 Th2 细胞优选的是活化的 Th2 细胞或记忆 Th2 细胞，特殊的例子包括具有 CD45RA-和 CD4+活性的细胞。

本发明重组抗体的细胞毒性活性在以下情况下产生，如当本发明抗体结合于 Th2 细胞诱导细胞凋亡。同时在诱导凋亡中，细胞可能被掩蔽和去除。

同时，诊断 Th2-介导的免疫疾病或癌症的方法包括存在于一个实验对象的细胞或组织中的人 CCR4 阳性细胞用以上方法进行免疫学诊断的方法。

此外，本发明的抗体可以用于 Th2 介导的免疫疾病或癌症，或由于 Th2 细胞的异常增多或减少导致病理状态不断发展的疾病中的诊断

剂。

还有，由于本发明抗体可以通过其细胞毒性减少或去除 CCR4-表达细胞，其可以提供对 Th2-介导的免疫疾病或癌症的治疗或诊断方法，包括使用本发明的抗体，和对 Th2-介导的免疫疾病或癌症的治疗剂和预防剂，其中包括将本发明抗体作为活性成分。

Th2-介导的免疫疾病包括，不考虑轻微或严重，如急性或慢性呼吸道超敏感性或支气管哮喘，特应性皮肤病包括特应性皮炎，过敏性鼻炎，花粉病等等发炎的疾病；由炎症敏感细胞导致的疾病，如嗜伊红粒细胞，肥大细胞等，它们可以由 Th2 细胞释放的细胞因子和趋化因子刺激增殖或活化，可以通过 Th2 细胞释放的细胞因子和趋化因子产生的生物学功能分子如 IgE 等引起，等等；和由于 Th2 细胞的异常变化导致的病理状态不断发展的免疫疾病。

本发明的抗体可以单独使用，但是一般优选的是，作为药物配方中的一种，与至少一种药学上可接受的载剂，按照药学上常规的技术工艺混合的方法使用。

在进行预想的治疗时，优选的是选择一种最有效的给药方式，如口服或肠胃外投药，如口内用药、气管用药、直肠用药、皮下注射、肌肉注射和静脉注射等等。在由抗体或多肽组成的配方中优选静脉注射。

药剂类型包括喷雾、胶囊、片剂、粒剂、糖浆、乳剂、栓剂、注射剂、药膏和带剂等等。

用于口服的合适配方包括乳剂、糖浆、胶囊、片剂、粉剂和粒剂等。

液体药剂包括乳剂和糖浆的制备可以通过添加剂，例如水；糖类如蔗糖，山梨醇，果糖等等；二醇类，如聚乙二醇，丙二醇等等；油类，如芝麻油，橄榄油，豆油，等等；抗菌药，如 p-羟基苯甲酸，等；气味剂，如草莓气味剂，胡椒薄荷，等等。

胶囊，片剂，粉剂，粒剂等可以通过使用添加剂，例如填充物如乳糖，葡萄糖，蔗糖，甘露醇；分散剂，如淀粉，海藻酸钠等；滑润剂如硬脂酸镁等；粘合剂如聚乙烯醇，羟丙基纤维素，明胶等；表面活性剂如脂肪酸酯等；增塑剂如丙三醇等。

适于肠胃外投药配方的例子包括注射，栓剂，喷雾剂等等。

注射剂可以通过用盐溶液，葡萄糖溶液或二者混合等等作载剂来制备。

栓剂可以通过用可可脂，硬化脂，羧酸等作为载剂来制备。

同时喷雾剂可以通过抗体或多肽自身，或使用不刺激病人口腔和呼吸道粘膜，且可以通过分散成小颗粒有助于抗体或多肽吸收的载剂等来制备。

载剂的例子包括乳糖，甘油等。依赖于抗体或多肽的性质来使用载剂，可以制作为气溶胶，干粉等等。在口服剂制备中使用的添加剂也可以加入到肠道外用药的制备中。

给药剂量和频度依赖于预想的治疗效果，给药方式，治疗期，年龄，体重等不同而不同，但剂量一般为每一个成人每天从 $10\mu\text{g/kg}$ 到 8mg/kg 。

附图简述

图 1 表示的是根据 ELISA 试验，KM2160 与一种化合物的反应性。

图 2 表示的是质粒 pKM2160VH41 和 pKM2160VL61 的构建步骤。

图 3 表示的是质粒 pKANTEX2160H 的构建步骤。

图 4 表示的是质粒 pKANTEX2160 的构建步骤。

图 5 表示的是纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的 SDS-PAGE (5%至 20%梯度胶) 电泳图。左边显示的是电泳在非还原条件下进行的结果，右边显示的是电泳在还原条件下进行的结果，泳道 1, 2, 3 和 4 分别代表高分子量参照物，KM2760，低分子量参照物和 KM2760 的电泳结果。

图 6 表示的是通过改变抗体浓度测定的纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 与 CCR4 部分肽的结合活性。纵坐标和横坐标分别表示 CCR4 的结合活性和抗体浓度。

图 7 表示的是通过免疫荧光活化细胞分离器测定的 KM2760 与 CCR4-高-表达细胞 (CCR4/EL-4) 的反应性。

图 8 表示的是对于 CCR4/EL-4 细胞 (上图) 和 EL-4 细胞 (下图) 的通过 ADCC 活性表示的细胞毒性。

图 9 表示的是对于人 PBMC 通过 ADCC 活性表示的细胞毒性, 根据对 CD4 和 CD45RA 有不同染色性质的四个组分中膜联蛋白 V 的阳性比率来测定。

图 10 表示的是抑制从人 PBMC 中产生 IL-4, IL-5, IL-13 和 IFN- γ 的抑制效果。

图 11 表示的是抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 与人 T 细胞白血病细胞系的反应性。

图 12 表示的是抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 对人 T 细胞白血病细胞系的细胞毒性, 其中已经确定了细胞系与抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的反应性。

图 13 表示的是当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 加入到小鼠(*Macaca fascicularis*) 中, IL-4 随着时间产生量的特征变化。

图 14 表示的是当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 加入到 *Macaca fascicularis* 中, IL-13 随着时间产生量的变化。

图 15 表示的是当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 加入到 *Macaca fascicularis* 中, IL- γ 随着时间产生量的变化。

图 16 表示的是当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 用于 hCCR4-高-表达鼠源细胞, CCR4/EL-4 细胞已经皮下移植的鼠中, 肿瘤体积的平均值随着时间产生的特征性变化。

图 17 表示的是当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 用于 hCCR4-高-表达鼠源细胞, CCR4/EL-4 细胞已经皮下移植的鼠中, 在施药组肿瘤体积的平均值与未施药组肿瘤体积的平均值的比率。

图 18 表示的是当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 用于 CCR4-表达人 T 细胞白血病细胞系 CCRF-CEM 细胞(ATCC CCL-119) 已经皮下移植的鼠中, 肿瘤体积的平均值随着时间的特征性变化。

具体实施方案

本发明的实施例如下所述, 但本发明不受它们的限制。

实施例 1

产生鼠抗-CCR4 单克隆抗体的杂交细胞的生产:

产生鼠抗-CCR4 单克隆抗体 KM2160(Int. Immunol., 11:81(1999))

的杂交细胞按以下程序生产。

(1) 制备抗原

人 CCR4 (以下称 hCCR4) 蛋白的氨基酸序列使用 Genetyx Max 分析, 选择化合物 1 作为合适的抗原的部分序列, 是从具有高亲水性、N 端、C 端片断中选择出来的。而且, 选择相应化合物 1 的鼠 CCR4(以下称 “mCCR4”)(BBRC,218:337(1996))蛋白的部分氨基酸序列作为化合物 2 (SEQ ID NO:2)。SEQ ID NO: 1 和 2 分别对应于人 CCR4 和鼠 CCR4 中从 N-端氨基酸计算起的第 2-29 位。

本发明中使用的氨基酸和它们的保护基团的缩写根据生化术语 IU PAC-IUB 联合委员会的推荐方案进行 (European Journal of Biochemistry, 138:9(1984))。

除非另外表示, 以下缩写表示以下氨基酸。

Ala: L-丙氨酸

Asn: L-门冬酰胺

Asp: L- 天冬氨酸

Asx: -天冬氨酸或 L- 门冬酰胺

Cys: L-半胱氨酸

Gln: L-谷氨酰胺

Glu: L-谷氨酸

Glx: L-谷氨酸或 L-谷氨酰胺

Gly: 甘氨酸

Ile: L-异亮氨酸

Leu: L-亮氨酸

Lys: L-赖氨酸

Met: L-甲硫氨酸

Phe: L-苯丙氨酸

Pro: L-脯氨酸

Ser: L-丝氨酸

Thr: L-苏氨酸

Tyr: L-酪氨酸

Val: L-缬氨酸

以下缩写表示相应氨基酸的保护基团和侧链保护氨基酸。

Fmoc: 9-芴甲氧基羰基

Tbu: t-丁基

Trt: 三苯甲基

Boc: t-丁基羰基

Fmoc-Thr(tBu)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-O- t-丁基-L-苏氨酸

Fmoc-Ser(tBu)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-O- t-丁基-L-丝氨酸

Fmoc-Tyr (tBu)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-O- t-丁基-L-酪氨酸

Fmoc-Lys(Boc)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-N ϵ -t-丁基氧碳化-L-赖氨酸

Fmoc-Asn(Trt)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-N γ -三苯甲基-L-门冬酰胺

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-N α -三苯甲基-L-谷酰胺

Fmoc-Asp(OtBu)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-L-天冬氨酸 β -t-丁基醚

Fmoc-Glu(OtBu)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-L-谷氨酸 γ -t-丁基醚

Fmoc-Cys(Trt)-OH: N α -9-芴甲氧基羰基-S-三苯甲基-L-半胱氨酸

PyBOP: 苯并三唑-1-基氧基三吡咯磷酸鎓

HOBt: N-羟基苯并三唑

DMF: N, N-二甲基甲酰胺

DCM: 二氯甲烷

TFA: 三氟乙酸

NMM: N-甲基吗啉

DTT: 二硫苏糖醇

(i) 化合物 1 的合成(SQ ID NO:1) (H₂Asn-Pro-Thr-Asp-Ile-Ala-Asp-Thr-Thr-Leu-Asp-Glu-Ser-Ile-Tyr-Ser-Asn-Tyr-Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ser-Ile-Pro-Lys-Pro-Cys-OH)

在自动合成仪的反应容器里(由 Shimadzu 制造),放入连接有 16.8 μ

摩尔 H-半胱氨酸(Trt)的 30 毫克载体树脂(三苯甲基氯树脂,由 AnaSpec 制造),往那里加入毫升 DCM/DMF (1: 1),搅拌 10 分钟后,将溶液抽走,再加入 1 毫升 DMF,搅拌 1 分钟后,将溶液抽走,然后根据 Shimadzu 提供的的合成方案进行以下程序。

(a) 搅拌在 DMF (588.2 μ l) 中的 Fmoc-pro-OH(168 μ 摩尔), PyBOP(168 μ 摩尔), HoBt.1H₂O(168 μ 摩尔)和 NMM(252 μ 摩尔)5 分钟,得到的溶液加入到树脂,然后搅拌 60 分钟,将溶液抽走。

(b) 载体树脂用 707 μ l 的 DMF 洗涤 1 分钟,重复此步骤 5 次。这样, Fmoc-Pro-Cys(Trt)合成到载体上。

接着,进行以下 Fmoc 基团去保护步骤。

(c) 加入 707 μ l30%的哌啶-DMF 溶液,然后搅拌 4 分钟,将溶液抽走,再重复此步骤。

(d) 用 707 μ lDMF 洗涤载体树脂 1 分钟,将溶液抽走,此步重复 5 次。

这样,获得连接有 Fmoc 基团-除去了 H-Pro-Cys(Trt)的载体树脂。

接着,进行浓缩反应,步骤(a)使用 Fmoc-Lys(Boc)-OH,然后通过洗涤步骤(b)和去保护步骤(c)和(d)在载体上合成 H-Lys(BOC)-Pro-Cys(Trt)。接着,在步骤(a)中按此顺序使用 Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH 重复步骤(a)到步骤(d)。接着,使用 Fmoc-Asn(Trt)-OH 进行浓缩反应的步骤(a),进行洗涤步骤(b),重复使用 Fmoc-Asn(Trt)-OH 的浓缩反应的步骤(a)和洗涤步骤(b),然后进行去保护步骤(c)和(d)。随后,按顺序使用 Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH 重复步骤(a)到(d)。接着,使用 Fmoc-Leu-OH 进行浓缩反应的步骤(a),进行洗涤步骤(b),重复使用 Fmoc-Leu-OH 的浓缩反应的步骤(a)和洗涤步骤(b),然后进行去保护步骤(c)和(d)。其后,按顺序在步骤 a 中使用 Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH 重复浓缩反应的步骤(a)和(b)两次,进行去保护步骤(c)和(d)。接着,在

重复完一系列这些步骤后,按顺序使用甲醇和丁基醚洗涤混合物,减压干燥 12 小时获得接有一侧链保护肽的载体树脂。往那里加入 TFA(90%),苯硫基甲烷(5%)和 1,2-乙烷二巯基化物(5%)的混合溶液 1 毫升,室温孵育 2 小时以除去侧链保护基团,同时从树脂中切去肽。过滤移去树脂后,在所得的溶液中加入 10 毫升的醚,离心重新获得沉淀,倾析,减压干燥,获得 63.7 毫克粗制肽。在 60 毫克 DTT 存在下粗制肽溶于 2 毫升 DMF,然后使用反向柱(CAPCELL PAK C18, 30mm I.D.X25 mm, 由 Shiseido 生产)的 HPLC 提纯。根据线性密度梯度的方法进行洗脱,含有 0.1%TFA 的 90%乙腈水溶液加入到 0.1%TFA 水溶液中,220nm 检测获得含有化合物 1 的部分。此部分冻干后,获得 2.5 毫克的化合物 1。

质谱分析(FAB MS): $m/z=3227.5(M+H^+)$

氨基酸分析: Asx 4.8(5), Glx 2.7(2), Ser 3.1(3), Thr 2.0(3), Ala 1.1(1), Pro3.1(3), Tyr3.8(4), Leu2.2(2), Lys1.2(1), Ile3.0(3), Cys1.2(1)

(ii) 合成化合物 2 (SEQ ID NO: 2)

(H-Asn-Ala-Thr-Glu-Val-Thr-Asp-Thr-Thr-Gln-Asp-Glu-Thr-Val-Tyr-Asn-Ser-Tyr-Tyr-Phe-Tyr-Glu-Ser-Met-Pro-Lys-Pro-Cys-OH)

使用 50 毫克连接有 28.0 μ 摩尔 H-Cys(Trt)的载体树脂作为起始物质,使用 Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH 使用如(i)的方式在步骤 a 中按此顺序重复步骤(a)到(d)。使用 Fmoc-Ser(tBu)-OH 进行浓缩反应的步骤(a),进行洗涤步骤(b),重复使用 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的浓缩反应的步骤(a)和洗涤步骤(b),然后进行去保护步骤(c)和(d)。随后,使用 Fmoc-Asn(Trt)-OH 进行浓缩反应的步骤(a),进行洗涤步骤(b),重复使用 Fmoc-Asn(Trt)-OH 的浓缩反应的步骤(a)和洗涤步骤(b),然后进行去保护步骤(c)和(d)。其后,按顺序使用 Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, 重复浓缩反应的步骤(a)和(d)。然后,使用 Fmoc-Gln(Trt)-OH 进行浓缩反应步骤 a,进行洗涤步骤(b),

使用 Fmoc-Gln(Trt)-OH 再重复进行浓缩反应步骤 a, 洗涤步骤(b), 进行去保护步骤(c)和(d)。其后, 按顺序在步骤 a 中使用 Fmoc Thr(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH 重复浓缩反应的步骤(a)和(b)两次, 进行去保护步骤(c)和(d)。重复完这一系列步骤后, 洗涤混合物, 干燥, 获得连接有侧链保护肽的载体树脂。去掉侧链保护基团获得粗制肽(96.3 克), 用如(i)同样的方法去掉树脂的肽, 使用反向柱 HPLC 进一步提纯, 获得化合物 2。

质谱分析(TOFMS): $m/z=3297.7(M+H^+)$

氨基酸分析: Asx4.1(4), Glx4.3(4), Ser2.0(2), Thr4.6(5), Ala1.0(1), Pro2.2(2), Tyr3.9(4), Val1.9(2), Met1.0(1), Phe1.0(1), Lys1.1(1), Cys1.1(1)

(2) 制备免疫抗原

为了增加它的免疫原性, 通过以下方法, 制备它与 KLH(Calbiochem)的共轭物, 然后在实施例 1(1)获得的 hCCR4 部分肽作为免疫原。即, KLH 溶于 PBS, 10 毫克/毫升, 后, 逐滴加入 1/10 体积的 25 毫克/毫升的 MBS (Nakalai Tesque) 搅拌 30 分钟。游离的 MBS 从凝胶过滤柱如 Sephadex G-25 柱中流出, 凝胶过滤柱预先用 PBS 等平衡。1 毫克得到的 KLH-MB 与 1 毫克溶于 0.1 磷酸钠缓冲液(pH7.0)的肽混合, 室温搅拌 3 小时。反应后, 混合物把 PBS 渗析出来。

(3) 动物免疫和产生生产抗体的细胞

实施例 1 (2) 制备的 100 微摩尔肽-KLB 与 2 毫克凝胶铝和 1×10^9 个百日咳菌苗(由中国血清研究所制造)注射入 5 周龄母鼠, 2 周后, 每周注射一次 100 微克此共轭物, 共注射 4 次。从每只动物的眼底静脉丛抽取血样, 用以下描述的酶联免疫测定法检测, 最后一次免疫后 3 天把脾从鼠身上切除, 显示有足量的抗体值。最后一次免疫 3 天后, 从鼠身上切除脾脏并在 MEM (由 Nissui Pharmaceutical 制造) 切成片, 用钳子把细胞分离, 离心(1200rpm, 5 分), 去上清, 3 毫升三羟甲基-氯化铵缓冲液(pH7.65)处理 1 到 2 分钟以去除红细胞。剩下的细胞进一步用 MEM 洗涤 3 次, 用于细胞融合。

(4) 制备鼠骨髓瘤细胞

培养 8-氮鸟嘌呤鼠骨髓瘤细胞系, P3X63Ag8U.1(ATCC CRL-1597,以下称“P3-U1”), 作为细胞融合的母亲系。

(5) 制备杂交瘤细胞

脾细胞和在实施例 1(3)和(4)中获得的骨髓瘤细胞以 10:1 的比率混合,离心(1200rpm,5 分), 去上清, 在 37℃条件下, 每 10^8 个脾细胞加入 0.5 毫升聚乙二醇溶液(含 2 克聚乙二醇-1000, 2 毫升 MEM, 0.7 毫升 DMSO), 完全悬浮。然后, 以 1 到 2 分钟的间隔加入 1 到 2 毫升 MEM 几次, 最后的体积用 MEM 调节至体积 50 毫升。离心去上清(900rpm, 5 分钟), 沉淀用 100 毫升 HAT 培养基悬浮, 以 100 微升/孔分散入 96 孔微量滴定板(由 Sumitomo Bakelite 制造), 5%二氧化碳培养箱 37℃培养 10 到 14 天。可以观察到融合细胞在孔中繁殖, hCCR4 部分肽(化合物 1)在培养基上清中的结合活性可以用在实施例 2 的 2(3)中描述的 ELISA 测量。活性被确定的每一孔用限制性稀释液总共 2 次克隆, 一次改变培养基为 HT 培养基, 然后改变培养基为一般培养基。这样, 获得产生鼠抗体 KM2160 的杂交瘤细胞 KM2160。如图 1 所示, KM2160 特异性地与 hCCR4 部分肽(化合物 1)反应。

实施例制备抗-CCR4 嵌合抗体

1 分离分析编码抗-CCR4 鼠抗体 V 区的 cDNA

(1) 从产生抗-CCR4 鼠抗体的杂交瘤细胞中制备 mRNA

从实施实施例 1 描述的杂交瘤细胞 KM1260 中制备 mRNA。根据使用说明使用 mRNA 制备试剂盒, Fast Track mRNA 分离试剂盒(Invitrogen 制造)从 8×10^7 个杂交瘤细胞 KM2160 中制备 48 微克 mRNA。

(2) 抗 CCR4 鼠抗体的 H 链和 L 链的 cDNA 文库的生产

根据使用说明使用 cDNA 合成试剂盒(由 Amersham Pharmacia Biotech 制造)从实施例 2 的 1(1)获得的 5 微克 KM2160 mRNA 中合成两端有 EcoRI-NotI 接头的 cDNA。制备的 cDNA 溶于 20 微升无菌水, 琼脂糖凝胶电泳分离, 使用 QIA 快速凝胶回收试剂盒(由 QIAGEN 制造)分别收回相对于 k 型 L 链的大约 1.0kb 的 cDNA 和相对于 IgG 型抗体 H 链的大约 1.5kb 的 cDNA 片断。然后, 使用 EcoRI/CIAP-预消化处理的 λ ZAPII 载体试剂盒(由 Stratagene 制造), 每 0.1 微克大约 1.5kb 的 cDNA 片断和 0.1 微克大约 1.0kb 的 cDNA 片断根据使用说

明与 1 微克限制性酶 EcoRI 消化, 小牛肠碱性磷酸酶末端去磷酸化的 λ ZAPII 载体连接。连接后, 根据使用说明使用 GigapackIII Gold Packaging Extract (由 Stratagene 制造), 将每个反应溶液的 2.5 微升包装入 λ 噬菌体中。然后用适当量的噬菌体感染大肠 细胞 XL1-Blue (Biotechniques, 5:376(1987)), 获得 9.3×10^4 噬菌体克隆作为 KM2160 H 链的 cDNA 文库和 7.4×10^4 噬菌体克隆作为 L 链 cDNA 文库。然后, 根据使用说明将每个噬菌体固定在尼龙滤膜 Hybond-N⁺ (由 Amersham Pharmacia Biotech 生产) 上。

(3) 抗-CCR4 鼠抗体的 H 链和 L 链的 cDNA 克隆

使用 ECL 直接核酸标记和检测系统 (由 Amersham Pharmacia Biotech 生产), 根据使用说明, 在尼龙滤膜上的实施例 2 的 1 (2) 制备的 KM2160 H 链 cDNA 文库和 L 链 cDNA 文库的克隆可以用鼠抗体(H 链是鼠 C γ 1cDNA 的 BamHI-EcoRI 片断(EMBO J., 3: 2047)1984))的 C 区 cDNA 检测, 作为探针的 L 链是 C κ cDNA 的 HpaI-EcoRI 片断, 每一 H 链和 L 链中得到与探针结合强的各 10 个噬菌体克隆。接着, 根据使用说明使用 λ ZAPII 克隆试剂盒(由 Stratagene 制造), 每个噬菌体克隆通过体内切割的方法转变为质粒。使用 BigDye terminator cycle sequencing Fs ready reaction Kit 试剂盒(由 PE Biosystems 制造), 用此方法获得的每个质粒包含的 cDNA 序列根据使用说明用由相同的制造者制造的 DNA 序列仪 ABI PRISM 337 分析。结果, 获得 ATG 序列认为是起始密码子的包含全长功能性 H 链的 cDNA 的质粒 pKM2160H4 和包含有全长功能性 L 链的 cDNA 的质粒 pKM2160L6。

(4) 分析抗-CCR4 鼠抗体 V 区的氨基酸序列

包含在质粒 pKM2160H4 中的 H 链 V 区的完全的核苷酸序列, 从那里得到 H 链 V 区的完全的核苷酸序列。包含在质粒 pKM2160L6 中的 L 链 V 区的完全的核苷酸序列, 从那里得到 L 链 V 区的完全的核苷酸序列, 它们分别描述于 SEQ ID NO: 3, 15, 4, 16。而且, SEQ ID NO: 15 和 16 表示的氨基酸序列不同于 SEQ ID NO: 3 和 4 表示的序列, 有很多核苷酸序列对应表示 SEQ ID NO: 15 和 16 的氨基酸序列。它们全部都包括在本发明所涉及的范围。与已知的鼠抗体的序列数据相比较 (Sequences of Protein of Immunological Interest, US Dept. health and h

uman services(1991))。使用蛋白质分析仪(PPSQ-10,由 Shimadzu) 比较提纯的抗-CCR4 鼠抗体 KM2160 的 H 链和 L 链的 N 端氨基酸序列的分析结果,发现分离的每一 cDNA 是编码抗 CCR4 鼠抗体 KM2160 的全长 cDNA,包含分泌信号序列,其是在 H 链的 SEQ ID NO: 15 表示的氨基酸序列的氨基酸位点 1-19 和显示于 L 链的 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列的氨基酸位点 1-19。

接着,检测抗-CCR4 的鼠抗体 KM2160 的 H 链和 L 链的 V 区氨基酸序列的新颖性。使用 GCG 程序包(版本 9.1,由 Genetics Computer Group 制造)作为序列分析系统,用 BLAST 法(Nucleic Acids Res.,25:3389(1997)搜索已知蛋白质的氨基酸序列数据库。结果,未发现 H 链和 L 链的完全一致的序列,所以断定鼠抗-CCR4 的抗体 KM2160 中的 H 链 V 区和 L 链 V 区具有新的氨基酸序列。

同时鼠抗-CCR4 的抗体 KM2160 的 H 链 V 区和 L 链 V 区的 CDRs 通过比较已知抗体的氨基酸序列来确定。鼠抗-CCR4 的抗体 KM2160 H 链 V 区的 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别见于 SEQ ID NO: 5, 6 和 7, L 链 V 区的 CDR1, CDR2, CDR3 的氨基酸序列分别见于 SEQ ID NO: 8, 9 和 10。

(7) 用动物细胞制备稳定表达的抗-CCR4 嵌合抗体

(1) 构建抗-CCR4 嵌合抗体表达载体 pKANTEX2160

抗-CCR4 嵌合抗体表达载体 pKANTEX2160 的构建如下,使用表达人 IgG1 和 κ 型的抗体的人源化抗体表达载体 pKANTEX93,且在实施例 2 中的 1(3)制备的质粒 pKM2160H4 和 pKM2160L6。

为了用 PCR 得到 KM2160 的 H 链 V 区的 cDNA 设计一个具有在 SEQ ID NO: 11 和 12 中核苷酸序列的合成的 DNA,和为了用 PCR 得到 KM2160 的 L 链 V 区的 cDNA 设计一个具有在 SEQ ID NO: 13 和 14 中核苷酸序列的合成的 DNA。每一个合成的 DNA 在其 5' 端都具有用于克隆至 pKANTEX93 的限制酶识别序列,且 DNA 的合成在有信誉的 Genset 公司进行。在实施例 2 的 1(3)中得到的质粒 pKM2160H4 (20ng) 加入到含有 50 微升的随 KOD DNA 聚合酶附带的 PCR 缓冲液 #1 (TOYOBO 制造)缓冲液中, 0.2mM dNTPs, 1mM $MgCl_2$ 和 0.5 μ M 含有 SEQ ID NO:11 和 12 的核苷酸序列的合成 DNA 引物,混合

物加热到 94℃ 3 分钟, 然后加入 2.5 单位的 KOD DNA 聚合酶 (TOYOBO 制造), 混合物随后进行 25 轮反应, 每一轮包括加热至 94℃ 30 秒, 58℃ 30 秒 74℃ 60 秒, 反应在 DNA 热循环仪 GenAmp PCR 系统 9600 (由 PERKIN ELMER 制造)。以同样的方式, 20ng 如实施例 2 的 1 (3) 得到的 pKM2160L6 质粒加入到含有 50 微升的随 KOD DNA 聚合酶附带的 PCR 缓冲液 #1 (TOYOBO 制造) 缓冲液中, 0.2mM dNTPs, 1mM MgCl₂ 和 0.5 μM 含有 SEQ ID NO:13 和 14 的核苷酸序列的合成 DNA 引物, PCR 的反应条件如上。10 μl 反应溶液用于琼脂糖凝胶电泳, H 链 V 的 PCR 产物大约 0.46Kb, L 链 VPCR 产物大约 0.43Kb, 有 QIA 快速凝胶抽提试剂盒抽提以上片段 (由 QIAGEN 制造)。

下一步, 通过用限制酶 SmaI (Takara Shuzo 制造) 消化质粒 pBruescript SK(-) (Stratagene 制造) 得到的 0.1 μg DNA 和大约 0.1 μg 每一 PCR 产物, 最后加入 0.5 μl 无菌水和 7.5 μl Takara DNA 连接试剂盒 Ver.2 (Takara Shuzo 制造) 的溶液 I, 和 0.3 μl 限制酶 SmaI, 混合物 22℃ 反应过夜。使用得到的重组质粒 DNA 溶液, 转化大肠杆菌 DH5 α (TOYOBO 制造)。从转化克隆中制备的每一质粒 DNA 使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (由 PE Biosystems 制造), 按照使用说明进行反应, 核苷酸序列的分析由相同的制造商制造的 DNA 序列分析仪 ABI PRISM 377 完成。最终得到具有所需的核苷酸序列的如图 2 的质粒 pKM2160VH41 和 pKM2160VL61。

下一步, 3 μg 人源化抗体表达载体 pKANTEX93 和以上得到的 3 μg pKM2160VH41 质粒加入到含有 30 μl 的 10mM Tris-HCl (pH7.5) 缓冲液中, 再加入 10mM MgCl₂ 和 1mM DTT, 10 单位的限制酶 ApaI (Takara Shuzo 制造)。反应溶液用乙醇沉淀, 得到的沉淀物加入到含有 10 μl 50mM Tris-HCl (pH7.5) 中, 100mM NaCl 10mM MgCl₂ 和 1mM DTT, 100 μg/ml 的 BSA, 0.01% 的 Triton X-100, 10 单位的限制酶 NotI (Takara Shuzo 制造) 加入其中。混合物 37℃ 反应一小时, 反应混合物用琼脂糖凝胶电泳分离, 分别回收 pKANTEX93 和 pKM2160VH41 的 ApaI-NotI 大约 12.75kb 和大约 0.44kb 的片段。得到的以上两种片段使用 Takara DNA 连接试剂盒 Ver.2 根据使用说明连接, 使用重组质粒 DNA 溶液转化大肠杆菌 DH5 α (TOYOBO 制造)。每一质粒 DN

A 从转化克隆中制备, 用限制酶酶切鉴定, 获得如图 3 所示的质粒, pKANTEK2160H, 其中插入了所需的 0.44kb 的 *ApaI*-*NotI* 片段。

下一步, 3 μ g 以上获得的 pKANTEK2160H 和 3 μ g 以上获得的 pKM2160VL61 加入到含有 50mM Tris-HCl(pH7.5)中, 100mM NaCl 10 mM $MgCl_2$ 和 1mM DTT, 100 μ g/ml 的 BSA, 溶液总体积 30 μ l, 加入 10 单位的限制酶 *BsiWI* (New England Biolabs 制造), 混合物 55 $^{\circ}$ C 反应一小时。然后加入限制酶 *EcoRI* (Takara Shuzo 制造), 混合物 37 $^{\circ}$ C 反应一小时, 反应混合物用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收大约 13.20 kb 和大约 0.41kb *EcoRI*-*BsiWI* 的 pKANTEK2160H 和 pKM2160VL61 片段。得到的以上两种片段使用 Takara DNA 连接试剂盒 Ver.2 根据使用说明连接, 使用重组质粒 DNA 溶液转化大肠杆菌 DH5 α (TOYOBO 制造)。每一质粒 DNA 从转化克隆中制备, 用限制酶酶切鉴定, 获得如图 4 所示的质粒, pKANTEK2160, 其中插入了所需的 0.41kb 的 *EcoRI*-*BsiWI* 片段。

获得的质粒 DNA 使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(由 PE Biosystems 制造)按照使用说明进行反应, 核苷酸序列的分析由相同的制造商制造的 DNA 序列分析仪 ABI PRISM 377 完成。最终确定得到含有编码 KM2160 的 H 链和 L 链 V 区的 cDNA 的质粒。

(2) 用动物细胞稳定表达抗-CCR4 嵌合抗体

使用如实施例 2 的 2 (1) 中得到的抗-CCR4 嵌合抗体表达载体 pKANTEK2160 表达在动物细胞中表达的抗-CCR4 嵌合抗体。

质粒 pKANTEK2160 用限制酶 *AatII* (TOYOBO 制造) 转变成线性, 且用其中 10 μ g 通过电穿孔法导入 4×10^6 大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0(ATCC CRL1662) (Cytotechnology, 3: 133 (1990)), 细胞悬浮于 40ml 的 H-SFM (GIBCO-BRL 制造) 培养基 (补充 5% FCS), 且以 200 μ l/孔分装于 96 孔板 (Sumitomo Bakelite 制造)。37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 24 小时以后, 加入 G418 至终浓度是 1mg/ml, 然后培养 1-2 周。从每一个出现了抗 G418 的转化子且发生融合的克隆中的孔中回收培养基上清, 上清中的抗-CCR4 嵌合抗体的抗原结合活性用实施例 2 的 2 (3) 所示的 ELISA 法测定 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗-人 IgG (γ))

抗体作为二抗)

为了增加抗体的表达量,使用 dhfr 基因扩增系统,抗-CCR4 嵌合抗体在培养基上清中表达,在这样孔中的转化子用含有 1mg/ml G418 和 50nM 的 dhfr 基因产物二氢叶酸还原酶(下文称为“DHFR”)的抑制物氨甲喋呤(下文称为“MTX”,Sigma 制造)的 H-SFM 培养基悬浮,密度为 $1-2 \times 10^5$ 细胞/ml,悬浮物以 1ml/孔分装入 24 孔板(Greiner 制造)。混合物 37°C, 5%CO₂ 培养箱培养 1-2 周,诱导出显示对 50nM MTX 有抗性的转化子。当转化子在孔中融合,培养基上清中的抗-CCR4 嵌合抗体的抗原结合活性用实施例 2 的 2(3)所示的 ELISA 测定。转化子在培养基上清中发现有抗-CCR4 嵌合抗体的表达的孔中,以同样的方式 MTX 浓度增加到 100nM,然后到 200nM,最后获得能在含有 1 mg/ml G418 和 200nM MTX 的 H-SFM 培养基中生长的转化子,能够高表达抗-CCR4 嵌合抗体。用限制性稀释分离两次,所获得的转化子单细胞分离(克隆)有最高的抗-CCR4 嵌合抗体表达的转化子克隆命名为 KM2760。KM2760 抗 CCR4 嵌合抗体表达量大约为 $5 \mu\text{g}/10^6$ 细胞/24 小时。另外 KM2760 抗体 H 链 C 区属于入 IgG1 亚类。KM2760 已经以 FERM BP-7054 KM2760 于 2000 年 2 月 24 日在国际贸易和工业部的工业科学技术部的国家生物科学和人类技术研究所保藏,(现用名:国家高级工业科学和技术研究所的国际专利生物保藏处)(Higashi 1-1-3, Tsukuba-shi, Ibaraki Prefecture, Japan)。

(3) 测定抗体对 CCR4 部分肽段的结合活性(ELISA)

在实施实施例 1(1)中获得的 hCCR4 部分肽段与甲状腺球蛋白(以下表示为“THY”)接合作为分析的抗原。生产方法见于实施实施例 1 (2),除了 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯(SMCC, Sigma 制造)代替 MBS 作为交联剂以外。以上方式制备的交联物以 $10 \mu\text{g/ml}$ 和 $50 \mu\text{g/ml}$ 分装至作 EIA 的 96 孔板(Greiner 制造)中,4°C 放置包被吸附过夜。用 PBS 洗涤后,用含有 1%BSA 的 PBS(以下表示为“1%BSA-PBS”),以 $100 \mu\text{l/孔}$ 加入,混合物室温反应 1 小时,以封闭仍有活性的基团。倾去 1%BSA-PBS 以后,稀释转化子培养上清溶液,提纯的鼠抗体或提纯的人嵌合抗体以 $50 \mu\text{l/孔}$ 分装,混合物室温反应 1 小时。反应后,每一孔用含 0.05% Tween20 的

PBS) (以下表示为“Tween-PBS”) 洗涤, 辣根过氧化物酶标记的兔抗-鼠 Ig 抗体溶液 (DAKO 制造) 用 1% 的 BSA-PBS 稀释 400 倍, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗-人 IgG (γ) 抗体溶液 (American Qualex 制造) 用 1% 的 BSA-PBS 稀释 3,000 倍, 分别分装至加入了鼠抗体的孔和加入了人嵌合抗体的孔中, 以 50 μ l/孔作为二抗。混合物室温作用 1 小时。反应后, 每孔用 Tween-PBS 洗涤, ABTS 溶液 (通过溶解 0.55g 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯硫吡咯因-6-磺酸) 胺在 1 升 0.1M 柠檬酸缓冲液 (pH4.2) 制备, 使用前加入 1 μ l/ml 过氧化氢) 以 50 μ l/孔分装用于显色, 在 415nm (以下表示为“OD₄₁₅”) 测定吸光度。

(4) 从培养基上清中纯化抗-CCR4 嵌合抗体

将在实施例 2 (2) 中得到的表达抗-CCR4 嵌合抗体的转化细胞克隆, KM2760, 悬浮于含有 200nM 的 MTX 和 5% 的 Daigo's GF21 (由 Wako Pure Chemical Industries 制造) 的 H-SFM (GIBCO-BRL 制造) 中, 得到的细胞密度为 $1-2 \times 10^5$ 细胞/ml, 在 175cm² 的烧瓶 (Greiner 制造) 中放入 100ml 细胞悬液。细胞 37°C, 5%CO₂ 培养箱培养 5-7 天, 当它们融合时, 回收培养基上清, 根据使用说明使用 Prosep-A 柱 (Bioprocessing 制造) 从 200ml 培养基上清中纯化抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760, 以获得大约 1.9mg 的纯化蛋白。根据已知方法 (Nature, 227;680 (1970)), 将 3 μ g 得到的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 应用于电泳以测定其分子量和纯度。结果表示于图 5 中。如图 5 所示, 在非还原条件下, 纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 大约是 150 千道尔顿 (以下表示为“Kd”); 在还原条件下, 检查到两条大约 50Kd 和大约 25Kd 的带。蛋白质的大小几乎与从 KM2760 的 H 链和 L 链 cDNA 核苷酸序列推断的分子量一致 (H 链: 49,226, L 链: 24,168), 也与报道的在非还原条件下 IgG 类型抗体的分子量大约为 150Kd 一致, 且在还原条件下, 由于分子间二硫键 (以下表示为“S-S 键”) 的切断, 降解为分子量大约为 50Kd 的 H 链和分子量大约为 25Kd 的 L 链 ((Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited (1996)), 这样就证明抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 表达为有正确结构的抗体分子。而且纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的 H 链和 L 链的

N 端氨基酸序列使用蛋白质测序仪 (PPSQ-10, Shimadzu 制造) 分析, 证明它们与抗-CCR4 鼠抗体 KM2160 的 N 端氨基酸序列吻合。

3. hCCR4 高效表达细胞的建立

(1) 构建用于动物细胞的表达载体 CAG-pcDNA3

用如以下所述的方法构建表达载体, 以生产表达载体 (CAG-pcDNA3), 其中动物细胞表达载体 pcDNA3 (INVITROGEN 制造) 的启动子区域, 从巨细胞病毒 (CMV) 启动子变为 CAG ((带有 CMV-IE 增强子的 AG 启动子 (修饰的鸡 β 肌动蛋白)), 且在载体中插入了 CCR4 基因。

pcDNA3 (5 μ g) 与限制酶 Nru I (Takara Shuzo 制造) 37°C 反应一小时, 然后用乙醇沉淀, 回收 DNA 片段。然后与限制酶 Hind III 反应 (Takara Shuzo 制造) 37°C 反应一小时, 用琼脂糖凝胶电泳分离以回收大约 5.8kb 含有无 CMV 启动子区域的 DNA 片段。具有 CAG 启动子区的质粒 CAG-pBluescript IKS (+) (Nuc.Acid.Res.,23:3816(1995)) (3 μ g) 与限制酶 SalI (Takara Shuzo 制造) 反应, 37°C 反应一小时, 然后用 37°C 反应用平端试剂盒 (Takara Shuzo 制造) 处理成平端, 用 HindIII 酶切, 37°C 反应一小时, 然后用琼脂糖凝胶电泳分离以回收大约 1.8kb 含有 CAG 启动子区域的 DNA 片段。分别回收的 DNA 片段用 DNA 连接试剂盒进行连接 (Takara Shuzo 制造), 用得到的重组质粒 DNA 转化大肠杆菌 DH5 α 来得到质粒 CAG-pcDNA3。

(2) 构建 hCCR4 表达载体

使用在实施例 2 的 3 (1) 中获得的 CAG-pcDNA3 和 hCCR4DNA-插入的 pcDNA3 (CCR4/pcDNA3), 按照如以下所述的方法构建 hCCR4 表达载体。CAG-pcDNA3 和 CCR4/pcDNA3 在 37°C 与 HindIII 反应一小时, 用乙醇沉淀, 回收 DNA 片段。然后, 37°C 与 BglII (Takara Shuzo 制造) 反应一小时, 通过琼脂糖凝胶电泳分离以回收含有 CAG 启动子区域的大约 2.0kb 的 DNA 片段和含有 hCCR4 基因区域的大约 5.5kb 的 DNA 片段。然后, 使用两种 DNA 片段, 用如实施例 2 的 3 (1) 中所述的同样方法制备质粒 CAG-CCR4/pcDNA3。

(3) 在动物细胞中 hCCR4 的表达

如实施例 2 的 2 (2) 所述的同样方式使用电穿孔法将质粒导入动

物细胞。将 EL-4 细胞 ATCC TIB-39)悬浮于 PBS (-) (GIBCO-BRL 制造) 中, 得到浓度为 1×10^7 细胞/500 μ l 的细胞悬液, 将实施例 2 的 3 (2) 中获得的 CAG-CCR4/pcDNA3 取 10 μ g 加入其中, 混合物冰浴 10 分钟, 然后置入专用小池 (Bio-Rad 制造), 在 260V 500 μ FD 进行基因导入。混合物进一步冰浴 10 分钟后, 细胞悬浮于 200ml 10% 的 FCS-RPMI 培养基并且按照 200 μ l/孔分装到用于细胞培养的 96 孔板中。培养后 24 小时。每一孔取出 100 μ l 的培养基上清, 再加入含有 1mg/ml 的 G418 的 10%FCS-RPMI 培养基 100 μ l/孔, 使终浓度为 0.5mg/ml。两周后, 选择 10 到 100 个的单克隆再培养。

(4) 选择 hCCR4 高效表达细胞

使用在实施实施例 1 (5) 中制备的 KM2160 细胞, 用免疫荧光法选择该细胞。在 96 孔 U 形板中, 将选择出的数十个具有基因导入的克隆中每一种取 2×10^5 的细胞分装于每一个孔中。用 FACS 缓冲液 (1% BSA-PBS, 0.02% EDTA, 0.05% NaN_3 , pH7.4) 将用已知标记方法 (Enzyme Antibody Method, 由 Gakusai Kikaku 出版) 进行了生物素标记的 KM2160 稀释至 5 μ g/ml, 加入人 IgG (Welfide 制造) 至 3.75mg/ml 来抑制非特异性染色, 每一个这样稀释的抗体溶液按 200 μ l/孔分装加入, 混合物在冰上反应 30 分钟。对于负对照, 在同样的浓度下使用生物素化的抗-IL-5R 的抗体 (WO97/10354)。用该缓冲液以 200 μ l/孔洗涤两次以后, 分装加入链亲合素-PE (Becton Dickinson Japan 制备) 20 μ l/孔。在暗处, 冰上反应 30 分钟后, 细胞用 200 μ l/孔洗涤 3 次, 且最终悬浮于 500 μ l, 荧光强度用流式细胞仪测量, 选择具有最强荧光强度的一株细胞系。

实施例 3

分析抗-CCR4 嵌合抗体的功能:

1. 评价抗-CCR4 嵌合抗体的活性

(1). 抗-CCR4 嵌合抗体对于人和鼠 CCR4 的反应性(ELISA)

纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 对人 CCR4 和鼠 CCR4 的反应性由 ELISA 测定, 见于实施例 2 的 2 (3)。由实施实施例 1 (2) 得到的 hCCR4 的部分肽段 (化合物 1) 和 mCCR4 的部分肽段 (化合物 2) 与 THY 接合且用于抗原。制备方法与实施实施例 1 (2) 同样的方法进

行,除了用 SMCC (Sigma 制备) 替代 MBS 作为交联剂。图 6 显示的是检测反应性的测试结果,在测试中,接合的 CCR4 肽吸附固定于 ELISA 板的每一个孔中,吸附量为 $10\mu\text{g/ml}$ 和 $50\mu\text{l/孔}$,加入的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的浓度是变化的。如图 6 所示,抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 与 hCCR4 和 mCCR4 的部分肽段在相似的水平有几乎完全的结合活性。以此结果为基础,发现抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 识别存在于人 CCR4 和鼠 CCR4 中从 N-端算起的第 2-29 位的表位区。

(2)抗-CCR4 嵌合抗体与 hCCR4-高-表达细胞的反应性(免疫荧光法)

纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 与由实施例 2 的 3(4)制备的 hCCR4-高-表达细胞(以后指“CCR4/EL-4”)的反应性用与实施例 2 的 3(4)相同的方式测定。如图 7 所示,抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 显示出与 CCR4/EL-4 细胞的强反应性。

2.抗-CCR4 嵌合抗体的体外细胞毒性(ADCC 活性)

为了评估纯化的由实施例 2 的 2(4)得到的 CCR4 嵌合抗体的体外细胞毒性活性,其 ADCC 活性按以下的方法测定。

(1) 制备靶细胞悬浮液

在实施例 2 的 3(4)得到的 hCCR4-高-表达细胞 CCR4/EL-4 用含有 0.5mg/ml 的 G418 的 $10\%\text{FCS-RPMI } 1640$ 培养基,得到的细胞密度为 1×10^6 细胞/ 0.5ml ,将 1.85MBq 当量的放射性活性的镓酸钠($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (Daiichi Pure Chemicals 制造)加入其中,混合物在 37°C 反应 1.5 小时,从而同位素标记细胞。反应后,细胞悬浮于 RPMI1640 培养基,离心,洗涤,重复三次,再悬浮于培养基, 4°C 冰浴 30 分钟,从而自然地释放放射性物质。离心后,加入 $5\text{ml } 10\%\text{FCS-RPMI1640}$ 培养基,得到 2×10^5 细胞/ ml ,混合物作为靶细胞悬浮液使用。

(2) 效应细胞悬浮液的制备

使用包含 200 单位($200\mu\text{l}$)的肝素钠注射液(Takeda Pharmaceutical 制造)的注射器收集健康人的外周血(60ml)。用相同量的生理盐水(Otsuka Pharmaceutical 制造)稀释两次,至总体积为 120ml 。以每管 5ml 分装 Lymphoprep (NYCOMED 制造)于 12 个 15ml 离心管中(Sunmitomo Bakelite 制造),稀释的外周血以每管 10ml 加到其上层,

混合物在室温 $800 \times g$ 离心 20 分钟。从离心管中收集血浆层和 lymphoprep 层之间的 PBMC 部分，并悬浮于含有 1%FCS- 的 RPMI 1640 培养基中（GIBCO 制造）（以下表示为“1%FCS-RPMI”），通过 $400 \times g$ 4°C 离心 5 分钟洗涤两次，最后重新悬浮，使浓度为 5×10^6 细胞/ml，用作效应细胞。

（3）测定 ADCC 活性

由实施例 3 的 2（1）制备的靶细胞悬液分装 $50 \mu\text{l}$ (1×10^4 细胞/孔) 至 96 孔 U 底板 (Falcon 制造) 的孔中。下一步，将在实施例 3 的 2（2）制备的效应细胞悬液以 $100 \mu\text{l}$ 的用量分装加入 (5×10^5 细胞/孔，效应细胞对靶细胞的比率为 50: 1)。然后加入每一种抗-CCR4 嵌合抗体，至终浓度 0.01 到 $10 \mu\text{g/ml}$ ，混合物 37°C 反应 4 小时。反应完成后，板离心，且用 γ -计数器测定每一孔 $100 \mu\text{l}$ 上清中 ^{51}Cr 的量。用与以上同样的方式，只是使用培养基代替效应细胞悬浮液和抗体溶液，用 γ -计数器测定上清中的 ^{51}Cr 的量，来计算自发解离的 ^{51}Cr 的量。用与以上同样的方式，只使用培养基代替抗体溶液，用 1N 的 HCl 代替效应细胞悬液，用 γ -计数器测定上清中的 ^{51}Cr 的量，来计算总解离的 ^{51}Cr 的量。ADCC 活性的计算通过以下公式完成：

$$\text{细胞毒性活性(\%)} = \frac{(\text{样品上清的 } ^{51}\text{Cr 的量}) - (\text{自发释放的 } ^{51}\text{Cr 的量})}{(\text{总 } ^{51}\text{Cr 的量}) - (\text{自发释放的 } ^{51}\text{Cr 的量})} \times 100$$

结果见于图 8。如图 8 所示，抗-CCR4 嵌合抗体显示出在 0.01 到 $10 \mu\text{g/ml}$ 范围内的抗体-浓度-依赖的强细胞毒性活性。以同样的方法测定没有基因导入的细胞系 EL-4 的 ADCC 活性作为负对照，其没有活性，因此可以确定细胞毒性活性是 CCR4-特异的。以上结果显示抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 可以通过有效激活人的效应细胞来降低或去除 CCR4-表达的 Th2 细胞，这对于诊断和治疗在人中的 Th2-介导的免疫疾病如支气管哮喘，特应性皮肤发炎等。

实施例 4

抗-CCR4 嵌合抗体对于人外周血的效用：

（1）人 PBMC 的 ADCC 活性测定

以与实施例 3 的 2 (2) 相同的方式分离 PBMC, 悬浮至终浓度为 1×10^7 细胞/ml。混合物分装 $100 \mu\text{l}$ /孔至在实施例 3 的 2 (2) 中使用的 U 板, 终密度为 1×10^6 细胞/孔。每一个 KM2760 和抗-IL-5 受体抗体的负对照 (WO 97/10354) 稀释至终浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$, 以 $100 \mu\text{l}$ /孔分装于已经分装了细胞的孔中。 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 的气流下, 培养 24 小时后, 回收细胞。细胞毒性的测定使用膜联蛋白 V-EGFP 凋亡检测试剂盒 (MBL 制造), 且膜联蛋白 V-阳性细胞被认为是死细胞。细胞 4°C , $400 \times g$ 离心 3 分钟, 悬浮于试剂盒配备的结合缓冲液中, 至浓度为 5×10^5 细胞/ $200 \mu\text{l}$ 。悬浮液与 $1 \mu\text{l}$ 膜联蛋白 V-EGFP 试剂混合, 随后用枪头混匀数次, 混合物避光反应 5 分钟。反应后, 混合物 4°C , $400 \times g$ 离心 3 分钟, 去上清。沉淀通过在涡流混合器上轻搅使其变松散, 加入在冰上预冷的 $100 \mu\text{l}$ 的含有甲醇的 2.5mM CaCl_2 , 混合物 4°C 温浴 10 分钟。混合物 $8000 \times g$ 离心 30 秒, 去上清。沉淀用 $200 \mu\text{l}$ 结合缓冲液悬浮且通过离心洗两次。去上清后的剩余的沉淀, 加入 $10 \mu\text{l}$ PC5-标记的抗-CD4 抗体 (Coulter 制造), $20 \mu\text{l}$ PE-标记的抗-CD45RA 抗体 (Coulter 制造), 和 $20 \mu\text{l}$ 含有 2.5mM CaCl_2 的 FACS 缓冲液, 混合物在 4°C 反应 30 分钟。此后混合物通过用含有 2.5mM CaCl_2 的 FACS 缓冲液离心洗涤 3 次, 用流式细胞仪 (Coulter 制造) 分析。首先, 依据其在 CD4 和 CD45RA 的染色特性的不同, 细胞分为四组分 (CD4+CD45RA+, CD4+CD45RA-, CD4-CD45RA+, CD4-CD45RA-), 测定在每一组分的膜联蛋白 V-阳性的比率, 并用它代表细胞毒性 (%)。结果见图 9, 只在与 KM2760 共培养的 PBMC 中观察到细胞毒性, 且只在属于 CCR4 阳性细胞的 CD4+CD45RA-组分中特异地检测到毒性。

(2) 抑制从人 PBMC 产生细胞因子的效应

以与实施例 3 的 2 (3) 描述的相同的方式, 通过共培养 PBMC 和 KM2760 (终浓度: $10 \mu\text{g/ml}$) 24 小时来诱导 ADCC 活性。培养后, $100 \mu\text{l}$ 上清去除, 加入 $100 \mu\text{l}$ 含有 $1 \mu\text{g/ml}$ 的 PMA (乙酸肉豆蔻佛波醇) 和 200ng/ml 的 A23187 (calcimycin: RBI 制造) 的培养基, PMA 和 A23187 的终浓度分别为 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 和 100ng/ml , 然后细胞因子通过刺激细胞来诱导产生 (条件 (I))。作为另一个刺激条件, 细胞因子的

产生是通过使用 50ng/ml 终浓度的抗-CD3 抗体 OKT-3 (ATCC CRL-8001) 代替 A23187 (条件 (ii))。加入每一个刺激试剂, 培养 24 小时后, 回收培养基上清, 使用细胞因子测定试剂盒 (BioSource 制造) 来测定 IL-4, IL-5, IL-13 和干扰素 (IFN) - γ 。如图 10 显示, Th2 细胞因子 IL-4, IL-5, IL-13 的产生在 KM2760-加入组中受到抑制, 但 Th1 的细胞因子 IFN- γ 的产生没有受到影响。

实施例 5

抗-CCR4 嵌合抗体与人 T 细胞白血病细胞系的反应性:

(1) 与膜表面的结合活性 (免疫荧光法)

抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 与以下 8 个人 T 细胞白血病细胞系的反应性用与实施例 2 的 3 (4) 同样的方法测定, HPB-ALL (Cancer Research, 54: 1511 (1994); 急性 T 细胞白血病), HSB-2 (ATCC CCL-120. 1; 白血病 (T 细胞)), MOLT-4 (JCRB9031; 淋巴瘤(T 细胞)), TALL-1(JCRB 0086; 白血病 (T 细胞)), Jurkat (ATCC TIB-152; 急性 T 细胞白血病), CCRF-CEM(ATCC CCL-119; 急性 T 细胞白血病), PEER (JCB 0830; 白血病 (T 细胞)) 和 Hut78 (ATCC TIB-161; 皮肤 T 细胞淋巴瘤)。在此实例中, 生物素化的 KM2760 的浓度变为 10 μ g/ml。如图 11 所示, 抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 显示出与 8 个测试细胞系中的 5 个细胞系 (HPB-ALL, Jurkat, CCRF-CEM, PEER 和 Hut78) 具有强反应性。

(2) ADCC 活性

在实施例 5 的 1 中已经证实与抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 有反应性的 5 个细胞系的 ADCC 活性的测定用与实施例 3 的 2 中所述方法进行。如图 12 所示, 抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 浓度依赖性的伤害了所有测试细胞。

实施例 5

评价抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的体内活性 (抑制 Th2 细胞因子的产生):

为了评价在实施例 2 的 2 (4) 中获得的纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的体内活性, 通过单只静脉注射抗体注射入老鼠 (*Macaca fascicularis*) 大约一个月内周期性收集血样, 用 PMA (佛波醇 12-肉豆

羧酸 13-乙酸, Sigma 制造) 和 IONOMYCIN (Sigma 制造) 刺激外周血白细胞诱导细胞因子产生, 测定 Th2 细胞因子, IL-4, IL-13 和 Th1 细胞因子, IFN- γ 。方法和结果在下面描述。

纯化的抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 的剂量 (蛋白含量) 是 0.1mg/kg, 1.0mg/kg 或 10mg/kg, 在每一剂量组通过单只静脉注射, 抗体注射于两只 4 周岁的雄性老鼠 (*Macaca fascicularis*)。在注射前和注射后第一周, 第二周, 第三周, 第四周从股静脉收集血样, 肝素 (肝素钠注射液, 1000 单位/ml Shimizu Pharmaceutical 制造) 作为抗凝集素使用, 加入到 1ml 的血中, 终浓度为 25 单位/ml。使用平底 24 孔板, 每个个体外周血以 500 μ l/孔分装入两孔。含有刺激剂 (PMA 终浓度 50ng/ml IONOMYCIN 终浓度为 1 μ g/ml) 的培养基加入到一孔中, 无刺激剂的培养基加入到另一孔中, 每一孔 500 μ l/孔, 混合物轻微搅拌 37°C, 5 %CO₂, 95% 空气培养 24 小时。另外加入 0.5ml 青霉素-链霉素溶液 (GIBCO BR 制造) 和 5.6ml 灭活的胎牛血清 (PAA Laboratories 制造) 到 100ml RPMI 1640 (GIBCO BRL) 中制备使用的培养基。培养后, 含有血细胞的肉汤培养基从每一孔中回收并离心 (6700 x g, 5 分钟, 4°C) 获得上清。从得到的培养基上清获得的 IL-4, IL-13 和 IFN- γ 分别由细胞因子测定试剂盒 (IL-4: OptEIA 人 IL-4 试剂盒, PharMingen 制造; IL-13 细胞筛选人 IL-13 免疫分析试剂盒 BioSource International 制造; IFN- γ 细胞筛选人 IFN- γ 免疫分析试剂盒 BioSource International 制造)。每一孔产生的细胞因子的含量通过从加入了刺激剂 (0.1mg/kg 组, 孔 Nos.L-1 和 L-2; 1.0mg/kg 组, 孔 Nos.M-1 和 M-2; 10mg/kg 组, 孔 Nos.H-1 和 H-2) 获得的量减去没有加入刺激剂所获得的量计算的数值。结果示于图 13-15。在这些图中注射前的每孔在 IL-4, IL-13 和 IFN- γ 中每一个的值作为 100%, 注射后产生的量以 % 显示。Th2 细胞因子, IL-4 (图 13) 和 IL-13 (图 14) 在所有的注射组注射后一周后都有大幅度的降低, 注射后 4 周抑制作用仍持续。另一方面, 对于 Th1 细胞因子 IFN- γ (图 15) 的影响是极小的。

基于这些结果, 发现当抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 注射入 *Macaca fascicularis* 后, 从外周血单核细胞产生 Th2 细胞因子会被抑制至少四周。也显示在 *Macaca fascicularis* 体内, 在外周血中抗 CCR4 嵌合抗体

KM2760 降低或去除了 CCR4-表达的 Th2 细胞。

实施例 6

抗 CCR4 嵌合抗体的体内抗肿瘤活性：

(1) 抗 CCR4 嵌合抗体 KM2760 对于同基因的腹腔内移植模型的抗肿瘤作用

测量抗 CCR4 嵌合抗体 KM2760 对于同基因的腹腔内移植模型的抗肿瘤作用，其中从实施例 2 的 2(4)获得的 hCCR4-高表达的鼠源 CCR4/EL-4 细胞移植入鼠的腹腔。使用 8-周龄雄性 C57BL/6 大鼠 (CLEA Japan)。CCR4/EL-4 细胞悬浮于 PBS (-) (GIBCO BRL 制造) 使细胞的密度为 1×10^5 细胞/ml，并以 $200 \mu\text{l}$ /动物的剂量注入 10 只 C57BL/6 大鼠的腹腔。移植后四小时，三天，六天，十天，用柠檬酸缓冲液 (10mM 的柠檬酸和 150mM 的 NaCl 水溶液，调 pH 至 6) 把 $200 \mu\text{l}$ KM2760 稀释到 2mg/ml，注射入 10 只动物中的 5 只的腹腔内。剩下的 5 只不注射嵌合抗体作为负对照组。从移植到由于肿瘤细胞扩增伴随腹水导致每一组大鼠死亡的天数见于表 1。负对照组的平均存活天数为 16.4 天，然而，注射了 KM2760 组的平均存活天数是 26.2 天。由于发现通过注射 KM2760，存活期延长了 59.8%，KM2760 对 CCR4 表达白血病细胞的同基因腹腔内移植模型有生命期延长效应。

表 1

	存活天数	平均值 (天)	存活率 (%)
负对照组	14/14/16/18/20	16.4	
KM2760 注射组	21/22/23/29/36	26.2	59.8

(2) 抗 CCR4 嵌合抗体 KM2760 在同基因皮下移植模型中的抗肿瘤作用

测定抗 CCR4 嵌合抗体 KM2760 在同基因皮下移植模型中的抗肿瘤作用，其中实施例 2 的 2 (4) 获得的 hCCR4 高表达鼠源 CCR4/EL-4 细胞皮下移植入大鼠。使用 8-周龄雄性 C57BL/6 大鼠 (CLEA Japan)。CCR4/EL-4 细胞悬浮于 PBS (-) (GIBCO BRL 制造) 使细胞的密度为 1×10^6 细胞/ml，并以 $50 \mu\text{l}$ /动物的剂量注入 18 只 C57BL/6 大鼠的腹侧皮下。用柠檬酸缓冲液 (10mM 的柠檬酸和 150mM 的 NaCl 水溶液，

调 pH 至 6) 把 100 μ l KM2760 稀释到 2mg/ml, 在移植后 4 小时每隔一天持续 5 天注射入 18 只动物中的 5 只的尾部静脉。在这种情况下每一次注射的剂量为 200 μ g /动物。另 6 移植后 4 小时, 7 天, 14 天, 200 μ l KM2760 用柠檬酸缓冲液稀释到 2mg/ml 注射入尾部静脉。在此情况下每只注射剂量为 400 μ g /动物。剩下的 7 只不注射嵌合抗体作为负对照组。移植后 6 天, 周期性地使用游标卡尺测量肿瘤直径, 通过每一注射组中肿瘤体积的平均值比每一非注射组的肿瘤体积平均值的比率和注射开始后的存活天数来确定抗肿瘤效应。肿瘤体积通过以下公式计算:

$$\text{肿瘤体积} = (\text{宽度})^2 \times \text{长度} \times 0.5$$

每一组肿瘤体积平均值示于表 2 和图 16, 每一注射组肿瘤体积平均值比每一非注射组的肿瘤体积平均值的比率的结果示于表 3 和图 17。移植后 18 天, 在 5 天持续注射 200 μ g 的组中, 每一 KM2760 注射组的肿瘤体积平均值比上非注射组肿瘤体积平均值的比率是 0.356, 在 3 次注射 400 μ g 的组该比率为 0.257, 所以 KM2760 在同基因皮下移植模型, 按照每一注射计划对于 CCR4-阳性白血病细胞的的生长有抑制作用。

表 2

组类别	移植后天数					
	0	6	10	12	15	18
负对照组	50 \pm 0	46 \pm 28	294 \pm 114	778 \pm 263	1825 \pm 708	3581 \pm 1279
KM2760200 μ gX5 天持续注射组	50 \pm 0	16 \pm 20	115 \pm 60	299 \pm 194	601 \pm 429	1274 \pm 886
KM2760400 μ gX 三次注射组	50 \pm 0	0 \pm 0	73 \pm 49	198 \pm 158	431 \pm 467	920 \pm 1163

单位: $\text{mm}^3 \pm$ 标准偏差

表 3

组类别	移植后天数					
	0	6	10	12	15	18
负对照组	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
KM2760 200 μgX5 天持续 注射组	1.000	0.348	0.393	0.384	0.330	0.356
KM2760400 μ gX 三次注射组	1.000	0.000	0.250	0.254	0.236	0.257

(3) 抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 异种移植模型的抗肿瘤作用

测定抗-CCR4 嵌合抗体 KM2760 大鼠皮下肿瘤的异种移植模型的抗肿瘤作用，其中 hCCR4 表达人 T 细胞白血病细胞系 CCRF-CEM 细胞（ATCC CCL-199）皮下移植入裸鼠。使用 8 周龄雄性的 Balb/c 裸鼠（CLEA Japan）。CCRF-CEM 细胞悬浮于 RPMI 1640 培养基（GIBCO BRL 制造）使得细胞密度为 1×10^8 细胞/ml，以 200 μl/动物的剂量移植入 20 只 Balb/c 裸鼠的腹侧皮肤。然后每组 5 个动物分为 4 组，移植后 4 小时，3 天，6 天，200 μl 的 KM2760 用柠檬酸缓冲液稀释到 2mg/ml，0.5mg/ml 或者 0.2mg/ml 注射到三个组的尾静脉。在此情况下，每个组 KM2760 的注射量是 400 μg/动物/天，100 μg/动物/天，40 μg/动物/天。把 200 μl 的人免疫球蛋白 G（以下表示为“hIgG”），用柠檬酸缓冲液稀释到 2mg/ml，注射到作为负对照组的剩下的一个组的尾静脉中（400 μg/动物/天）。移植后 4 天，使用游标卡尺周期性测量肿瘤直径，每一组用肿瘤体积判定抗肿瘤效果。肿瘤体积用以下公式计算：

$$\text{肿瘤体积} = (\text{宽度})^2 \times \text{长度} \times 0.5$$

每一组肿瘤体积的平均值随时间的改变量显示于表 4 和图 18，在所有的注射 KM2760 组，都可以观察到完全的肿瘤生长移植作用，所以，KM2760 对 CCR4-阳性白血病细胞皮下肿瘤异种移植模型有生长抑制效应。

表 4

组类别	移植后天数					
	0	6	10	12	15	18
负对照组	0±0	44±63	204±159	233±157	364±86	448±142
KM2760 40 μg 注射组	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
KM2760 100 μg 注射组	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
KM2760 400 μg 注射组	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

单位: $\text{mm}^3 \pm \text{标准偏差}$

工业适用性

如以上所描述的, 根据本发明, 提供了关于特异性结合到人 CCR4 和包含有对 CCR4 是新的 CDR 的重组抗体和抗体片段。通过免疫染色法, 本发明抗体可以应用于对于人 Th2 细胞的免疫检测中, 应用于诊断或治疗所有的 Th2-介导的免疫疾病包括支气管哮喘和特应性皮肤病, 其中由于 Th2 细胞和包括血癌例如白血病在内的癌症的异常平衡而导致的病理情况发展。

序列列表中的随意版本

SEQ ID NO: 11-合成序列的说明: 合成 DNA

SEQ ID NO: 12-合成序列的说明: 合成 DNA

SEQ ID NO: 13-合成序列的说明: 合成 DNA

SEQ ID NO: 14-合成序列的说明: 合成 DNA

P-36976
序列列表

<110> 协和发酵工业株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)

<120> 基因重组抗体及其抗体片断

<130> P-36976

<150> JP 2000-59508

<151> 2000-03-03

<150> JP 2000-401563

<151> 2000-12-28

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Asn	Pro	Thr	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Ile	Tyr	Ser
1				5					10					15	

Asn	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Lys	Pro	Cys
			20					25			

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

Asn	Ala	Thr	Glu	Val	Thr	Asp	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	Thr	Val	Tyr	Asn
1				5					10					15	

Ser	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Ser	Met	Pro	Lys	Pro	Cys
			20					25			

<210> 3

<211> 414

<212> DNA

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (414)

<400> 3

```

atg aac ctc ggg ctc agt ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48
Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
  1             5             10             15

gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gac tta atg aag 96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
          20             25             30

cct gga ggg tcc ctg aaa atc tcc tgt gca gcc tct gga ttc att ttc 144
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
          35             40             45

agt aat tat ggc atg tct tgg gtt cgc cag act cca gac atg agg ctg 192
Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu
          50             55             60

gaa tgg gtc gca acc att agt agt gct agt act tat tcc tat tat cca 240
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro
  65             70             75             80

gac agt gtg aag gga cga ttc acc ata tcc agg gac aac gcc gag aac 288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn
          85             90             95

tcc cta tat ctg caa atg aat agt ctg agg tct gag gac aca ggc ata 336
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile
          100            105            110

tat tac tgt gga aga cat agc gat gga aac ttc gcg ttt ggt tat tgg 384
Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
          115            120            125

ggc cga ggg act ctg gtc act gtc tct gca 414
Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
  130            135

```

<210> 4

<211> 396

<212> DNA

<213> 小鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (396)

<400> 4
 atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

 tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

 agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cgg aac att 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
 35 40 45

 gtt cat att aat ggt gac aca tat tta gaa tgg tac ctg cag aga ccg 192
 Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
 50 55 60

 ggc cag tct cca aag ctc cta atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

 ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

 ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

 ttt caa ggt tca ctt ctt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc agg ctg 384
 Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu
 115 120 125

 gaa atc aga cgg 396
 Glu Ile Arg Arg
 130

 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小鼠(Mus musculus)

 <400> 5
 Asn Tyr Gly Met Ser
 1 5

 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 6

Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 7

His	Ser	Asp	Gly	Asn	Phe	Ala	Phe	Gly	Tyr
1				5					10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 8

Arg	Ser	Ser	Arg	Asn	Ile	Val	His	Ile	Asn	Gly	Asp	Thr	Tyr	Leu	Glu
1				5					10					15	

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 9

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
1				5		

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠(Mus musculus)

<400> 10

Phe	Gln	Gly	Ser	Leu	Leu	Phe	Trp	Thr
1				5				

<210> 11

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成 DNA

<400> 11

aaggaaaaaa gcggccgcga cccctcacca tgaacctcg

39

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成 DNA

<400> 12

cgatgggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccag

39

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成 DNA

<400> 13

ccggaattcg cctcctcaaa atgaagttgc c

31

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成 DNA

<400> 14

agccaccgta cgtctgattt ccagcctggt g

31

<210> 15

<211> 138

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 15

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Met Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Met Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Ala Ser Thr Tyr Ser Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Ile
100 105 110

Tyr Tyr Cys Gly Arg His Ser Asp Gly Asn Phe Ala Phe Gly Tyr Trp
115 120 125

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135

<210> 16

<211> 132

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 16

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Asn Ile
35 40 45

Val His Ile Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Arg Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

100	105	110
Phe Gln Gly Ser Leu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu		
115	120	125
Glu Ile Arg Arg		
130		
<210> 17		
<211> 360		
<212> PRT		
<213> 人(Homo sapiens)		
<400> 17		
Met Asn Pro Thr Asp Ile Ala Asp Thr Thr Leu Asp Glu Ser Ile Tyr		
1	5	10
Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys Pro Cys Thr Lys Glu		
20	25	30
Gly Ile Lys Ala Phe Gly Glu Leu Phe Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu		
35	40	45
Val Phe Val Phe Gly Leu Leu Gly Asn Ser Val Val Val Leu Val Leu		
50	55	60
Phe Lys Tyr Lys Arg Leu Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn		
65	70	75
Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Val Phe Ser Leu Pro Phe Trp Gly		
85	90	95
Tyr Tyr Ala Ala Asp Gln Trp Val Phe Gly Leu Gly Leu Cys Lys Met		
100	105	110
Ile Ser Trp Met Tyr Leu Val Gly Phe Tyr Ser Gly Ile Phe Phe Val		
115	120	125
Met Leu Met Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe		
130	135	140
Ser Leu Arg Ala Arg Thr Leu Thr Tyr Gly Val Ile Thr Ser Leu Ala		
145	150	155
Thr Trp Ser Val Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Phe Leu Phe Ser		
165	170	175
Thr Cys Tyr Thr Glu Arg Asn His Thr Tyr Cys Lys Thr Lys Tyr Ser		
180	185	190

Leu Asn Ser Thr Thr Trp Lys Val Leu Ser Ser Leu Glu Ile Asn Ile
 195 200 205

Leu Gly Leu Val Ile Pro Leu Gly Ile Met Leu Phe Cys Tyr Ser Met
 210 215 220

Ile Ile Arg Thr Leu Gln His Cys Lys Asn Glu Lys Lys Asn Lys Ala
 225 230 235 240

Val Lys Met Ile Phe Ala Val Val Val Leu Phe Leu Gly Phe Trp Thr
 245 250 255

Pro Tyr Asn Ile Val Leu Phe Leu Glu Thr Leu Val Glu Leu Glu Val
 260 265 270

Leu Gln Asp Cys Thr Phe Glu Arg Tyr Leu Asp Tyr Ala Ile Gln Ala
 275 280 285

Thr Glu Thr Leu Ala Phe Val His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Ile Tyr
 290 295 300

Phe Phe Leu Gly Glu Lys Phe Arg Lys Tyr Ile Leu Gln Leu Phe Lys
 305 310 315 320

Thr Cys Arg Gly Leu Phe Val Leu Cys Gln Tyr Cys Gly Leu Leu Gln
 325 330 335

Ile Tyr Ser Ala Asp Thr Pro Ser Ser Ser Tyr Thr Gln Ser Thr Met
 340 345 350

Asp His Asp Leu His Asp Ala Leu
 355 360

FIG.1

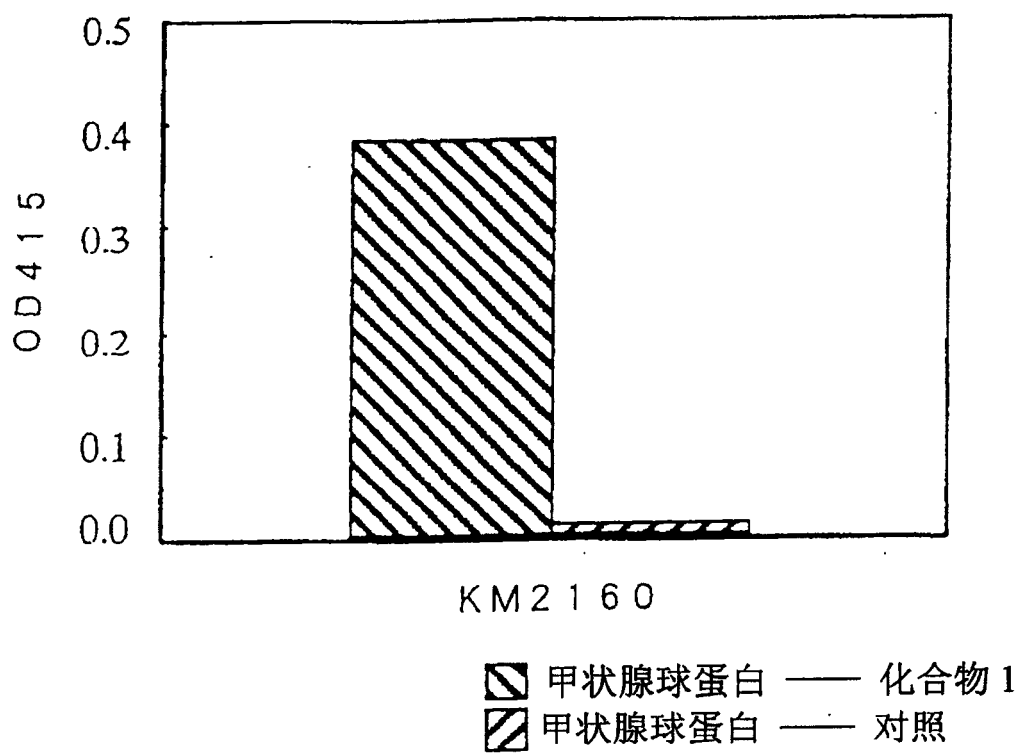


FIG.2

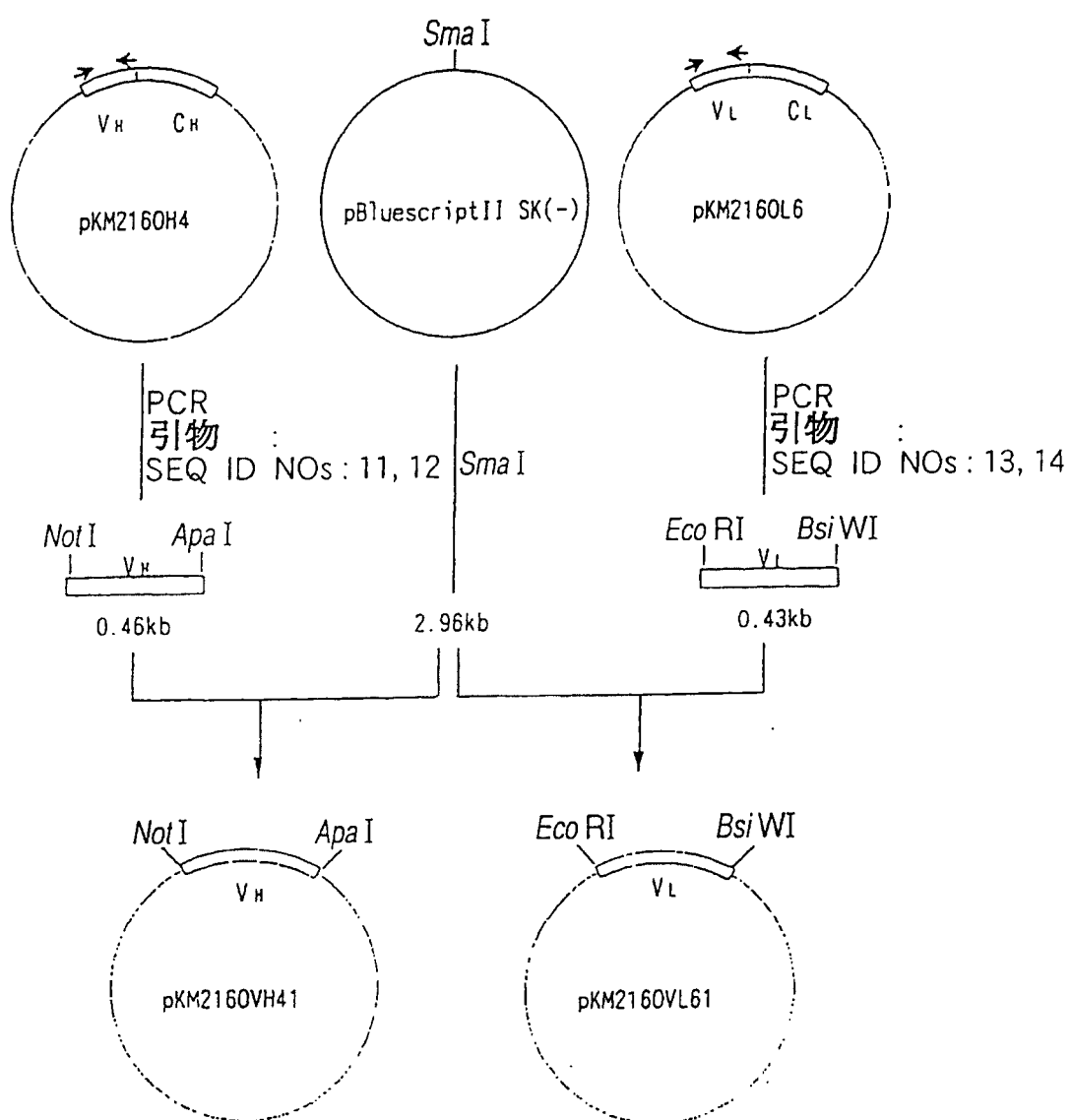


FIG.3

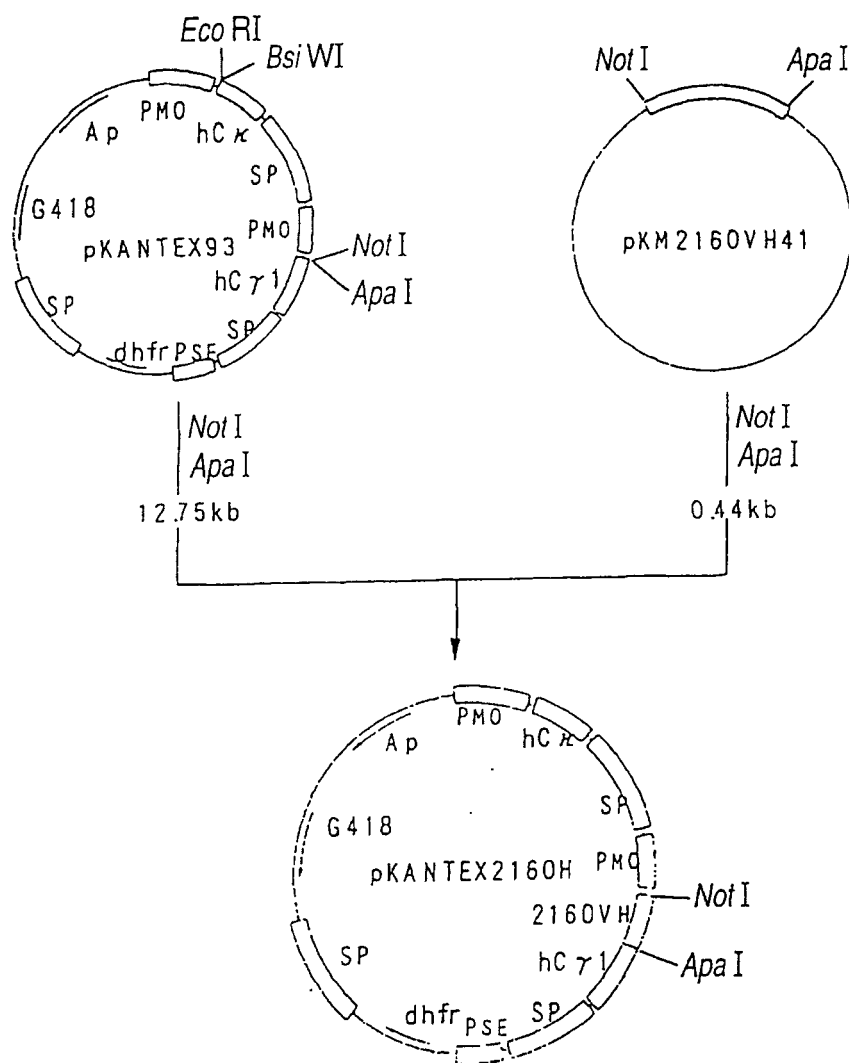


FIG.4

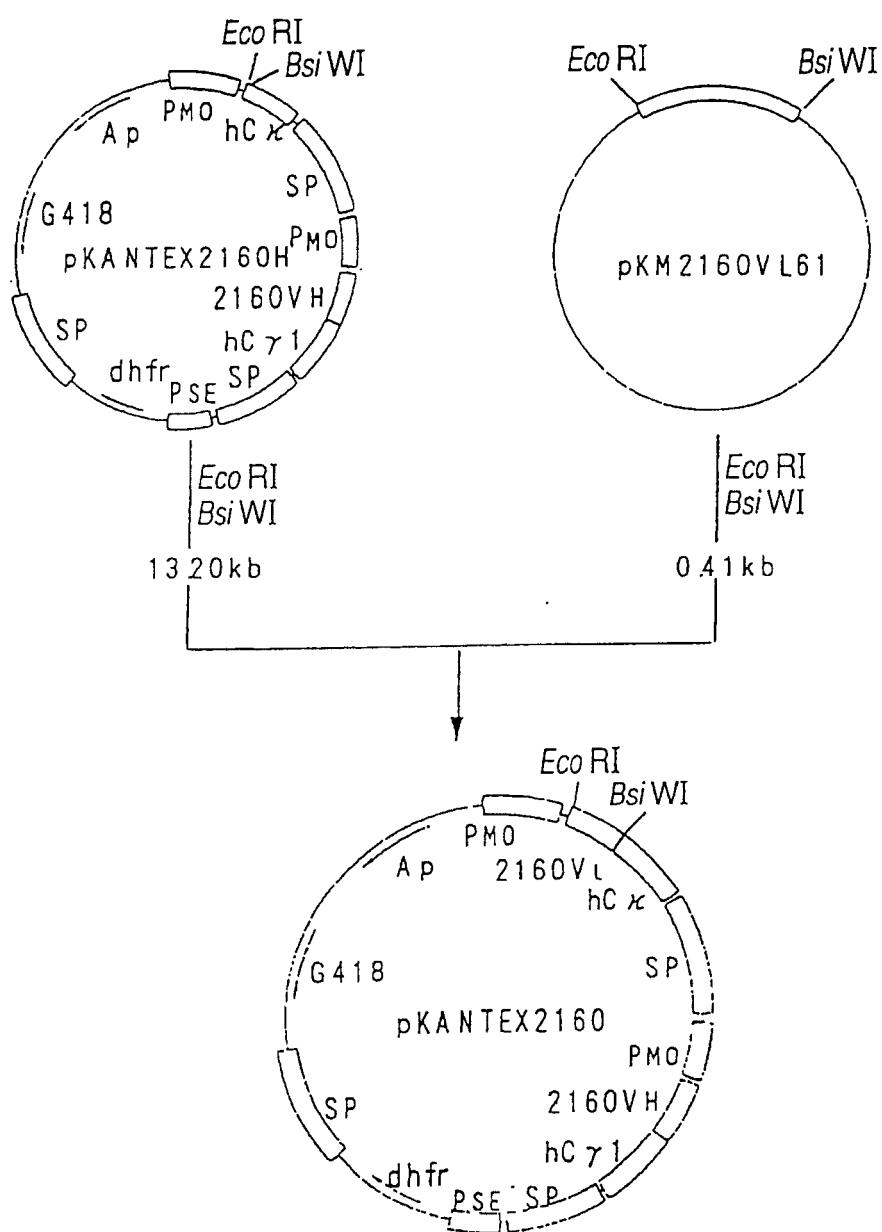


FIG.5

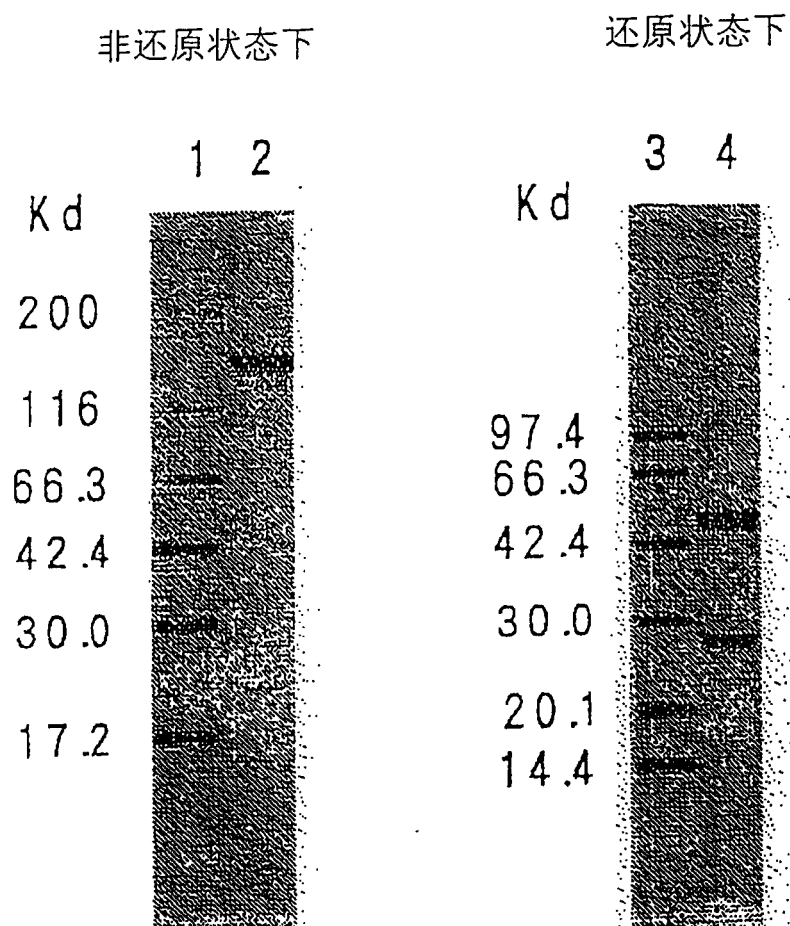


FIG.6

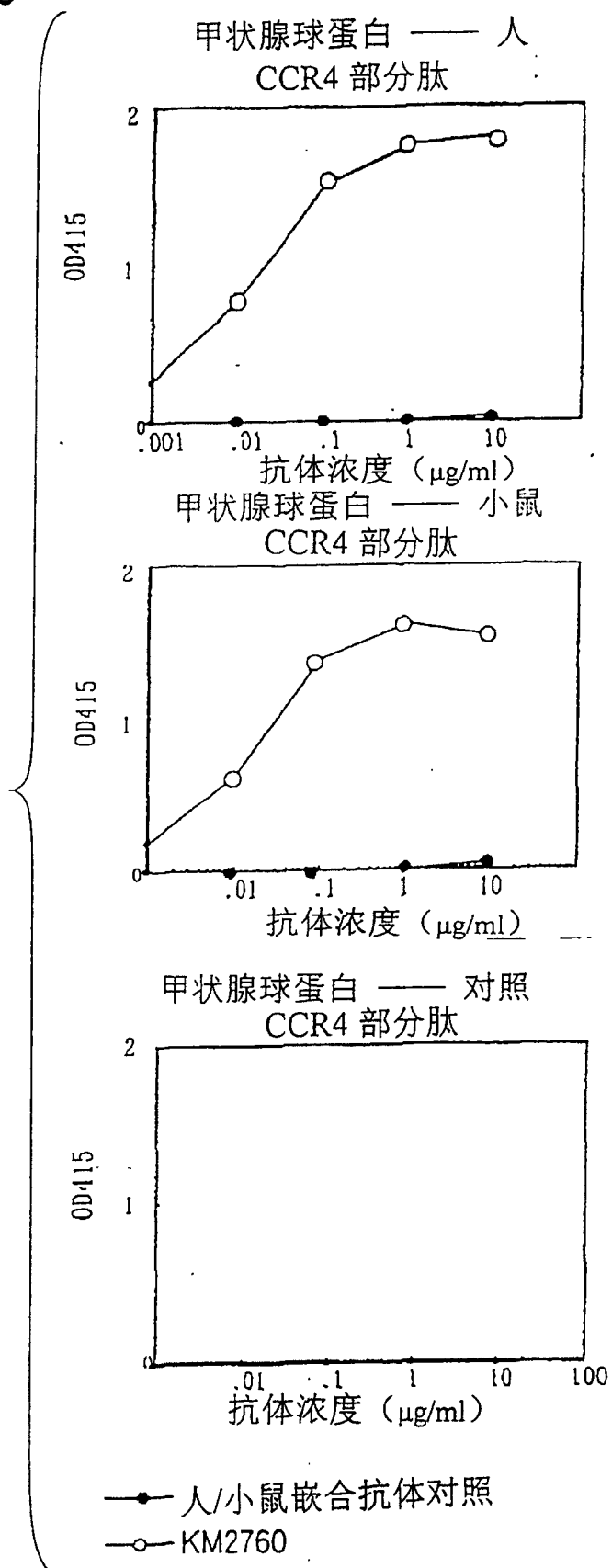


FIG.7

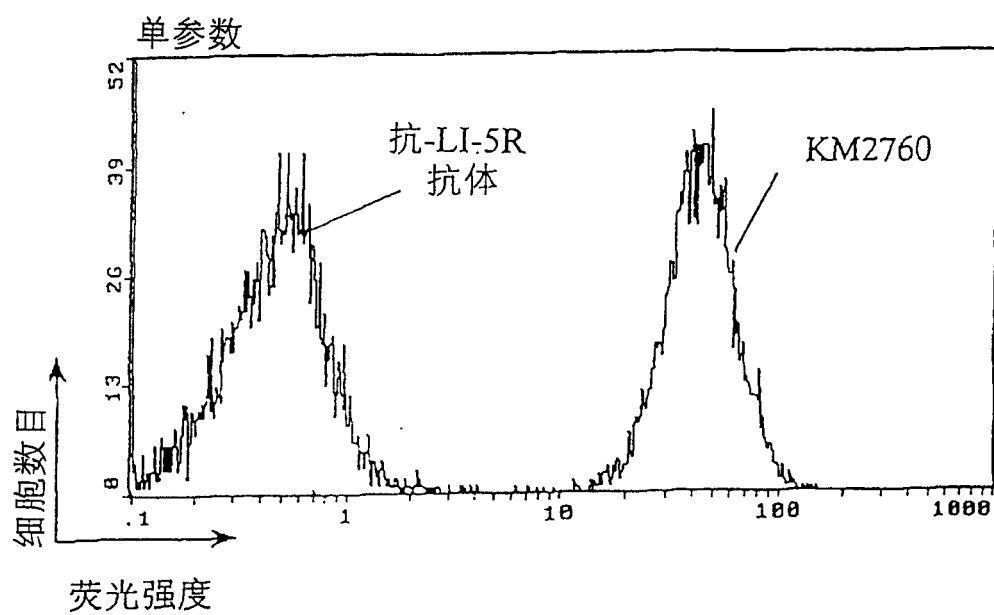


FIG.8

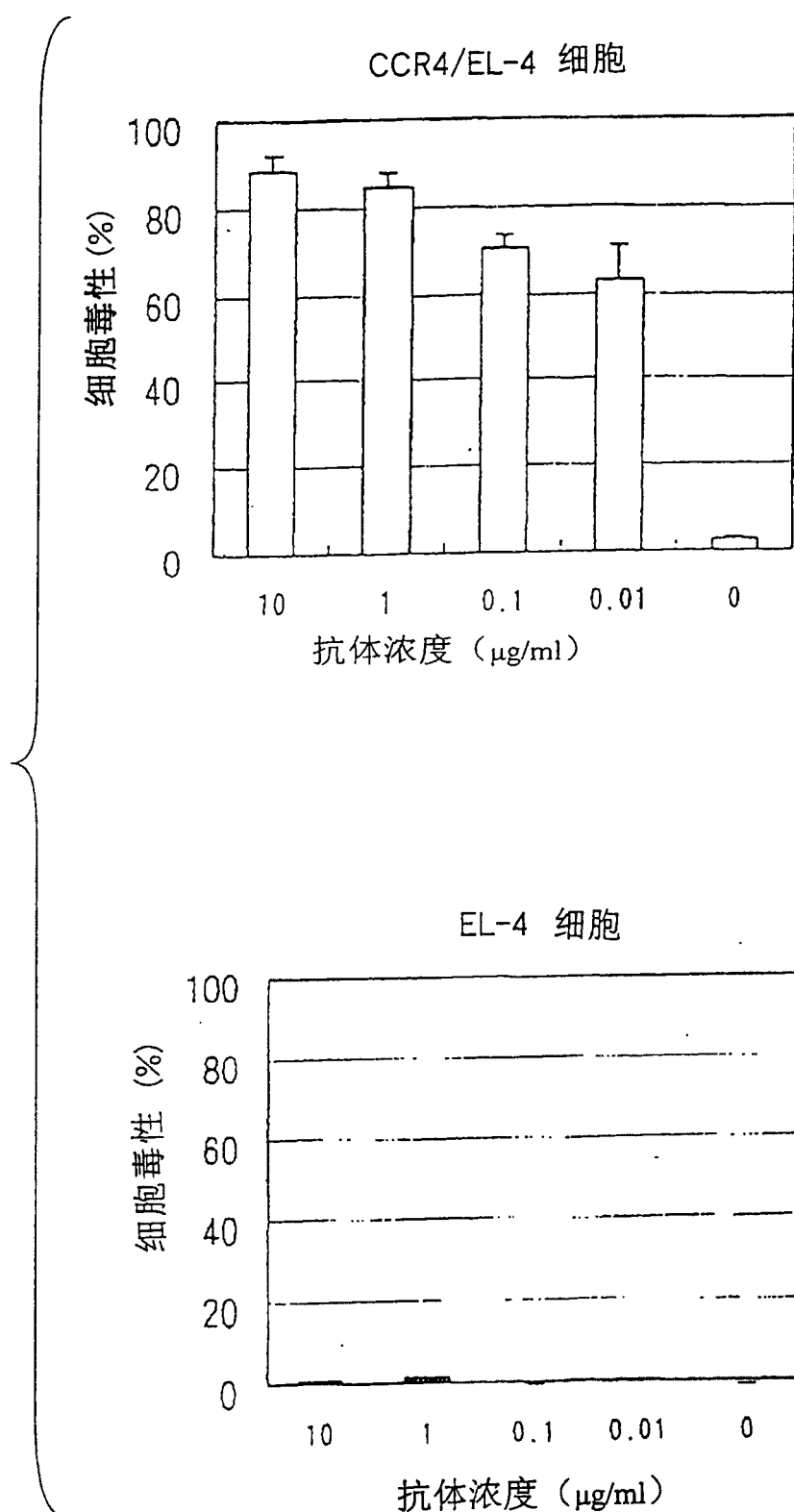


FIG.9

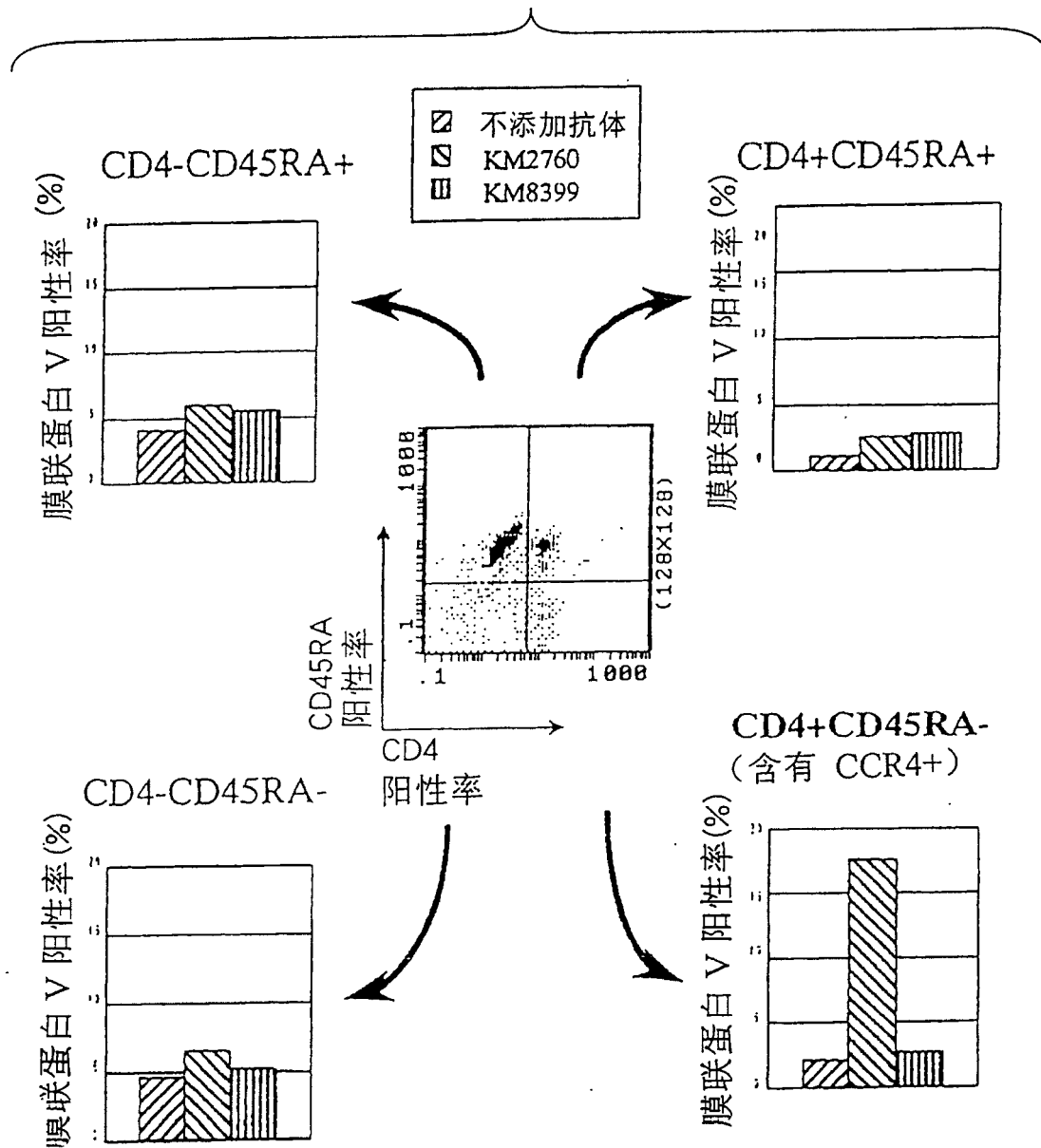
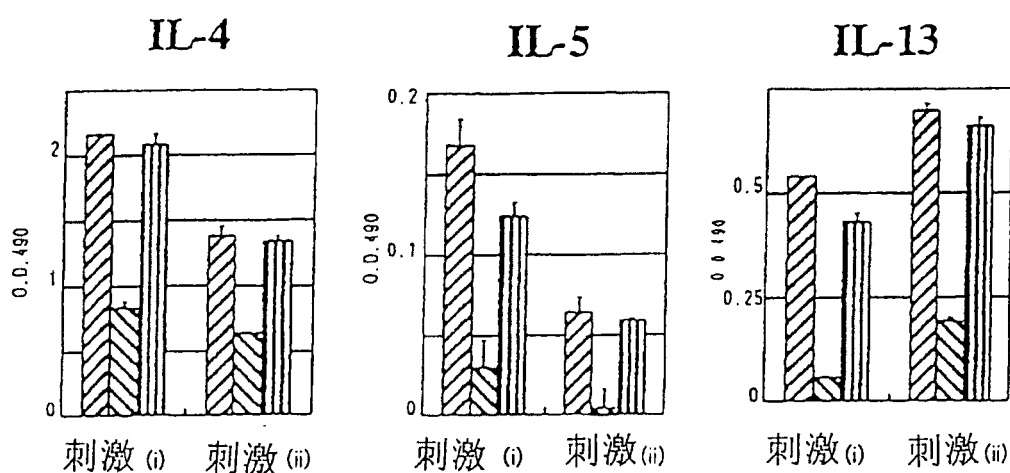
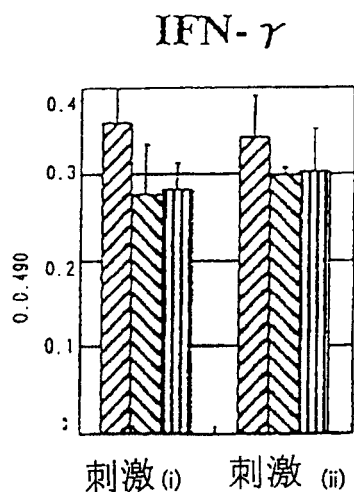


FIG.10

Th2 细胞因子



Th2 CYTOKINE



不添加抗体
 KM2760
 KM8399

FIG.11

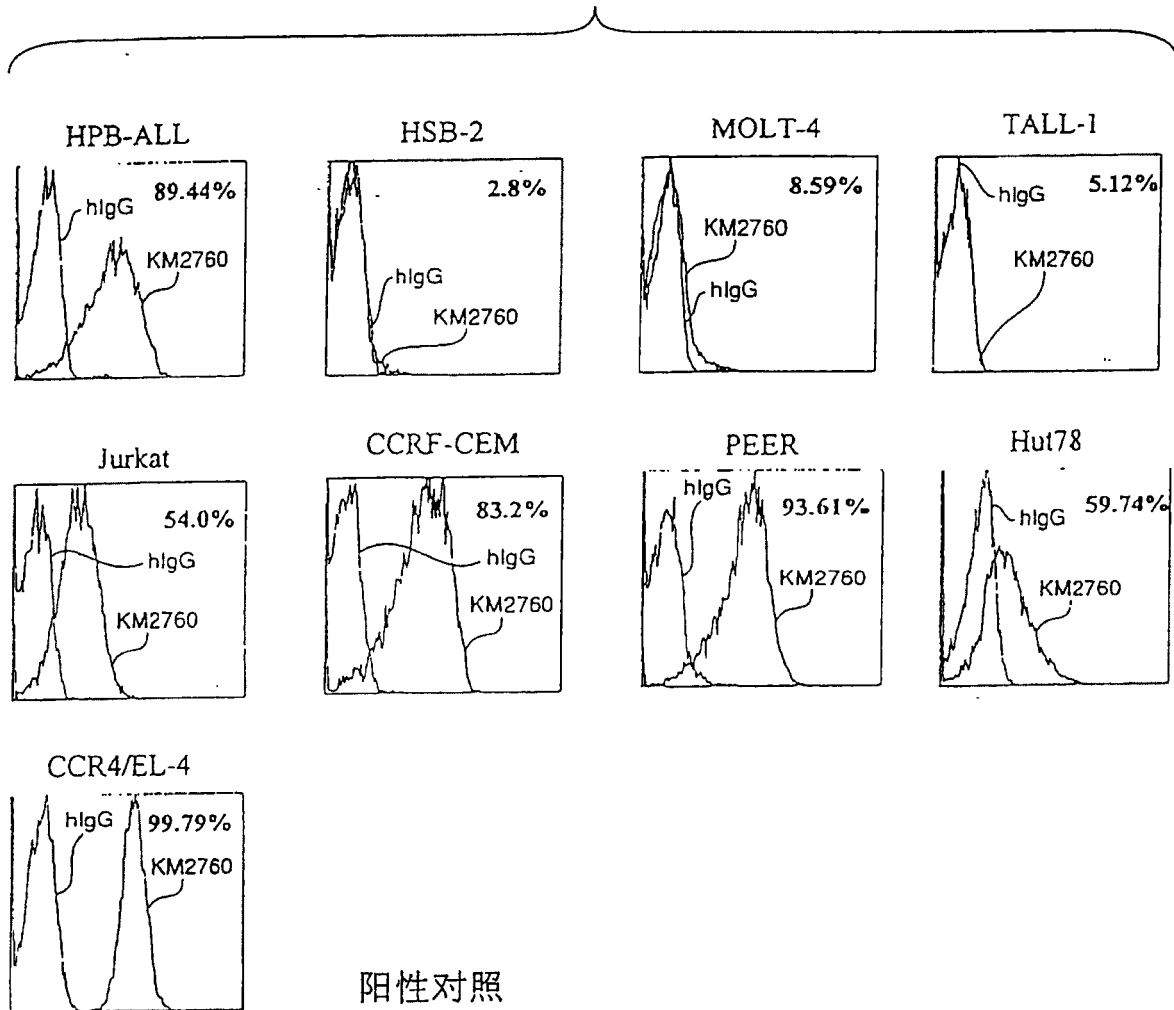


FIG.12

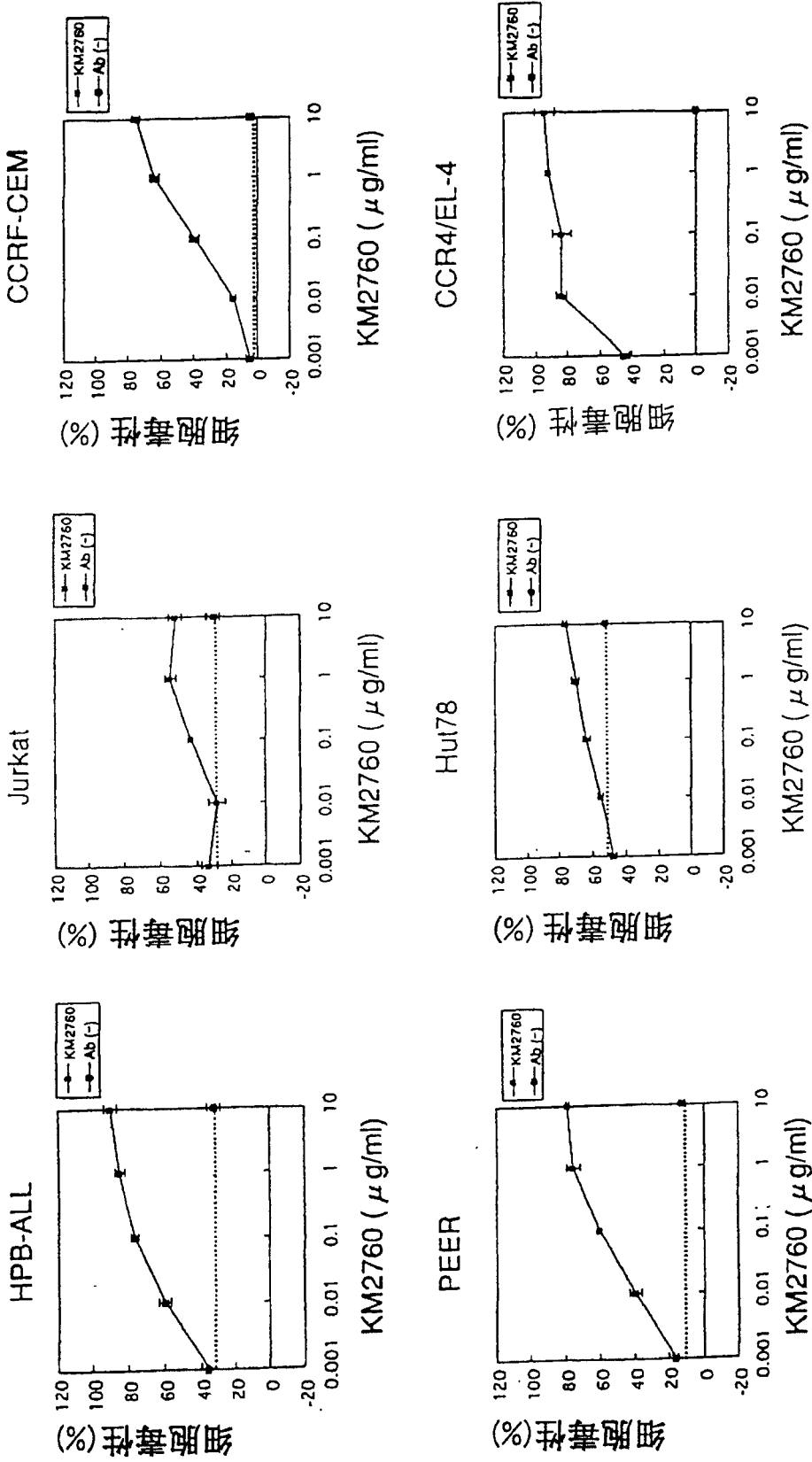


FIG.13

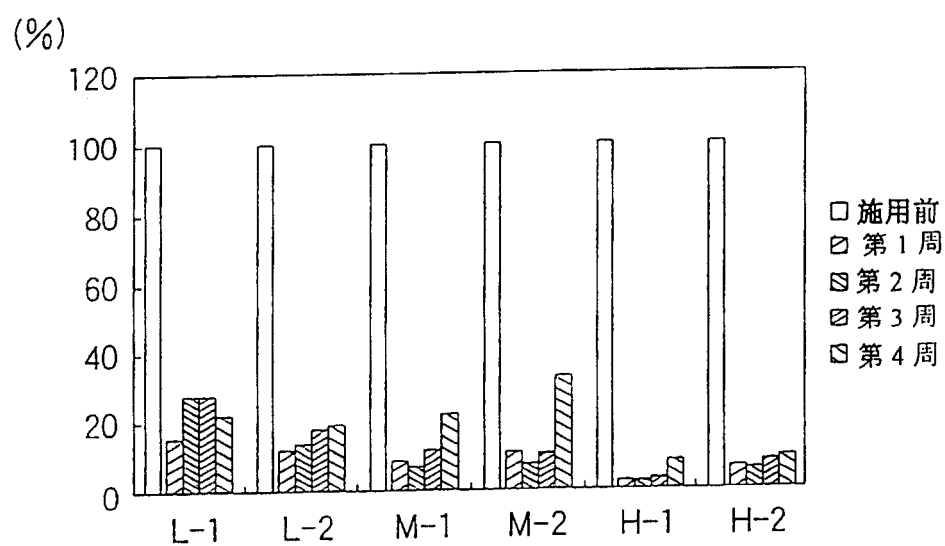


FIG.14

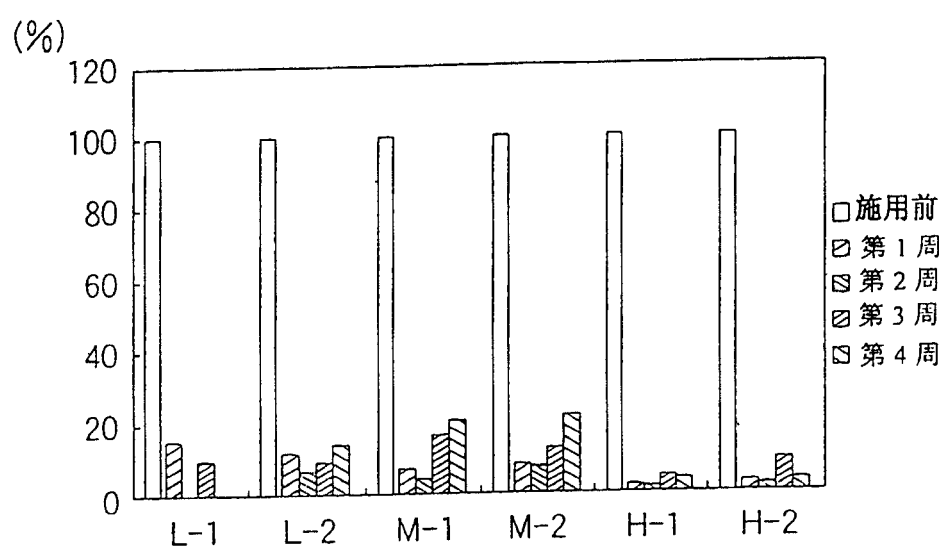


FIG.15

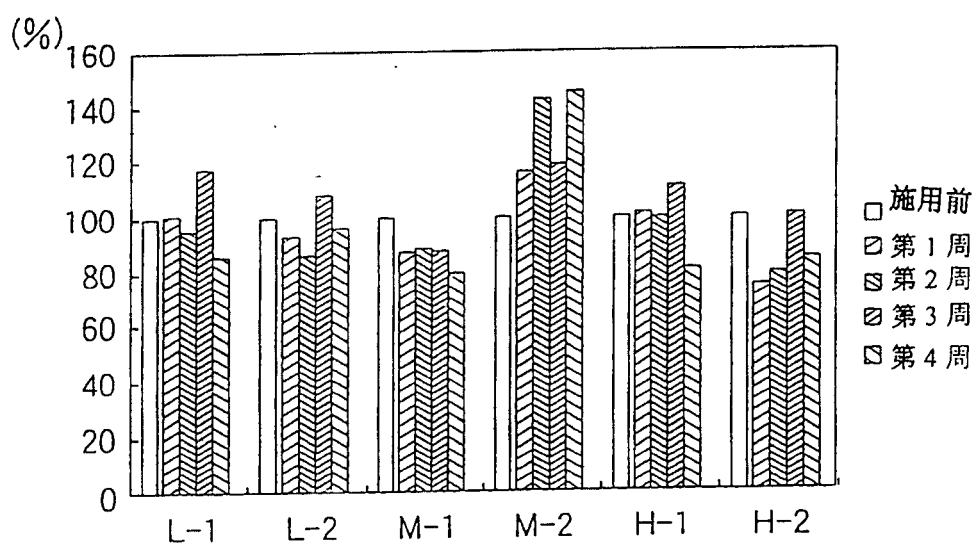


FIG.16

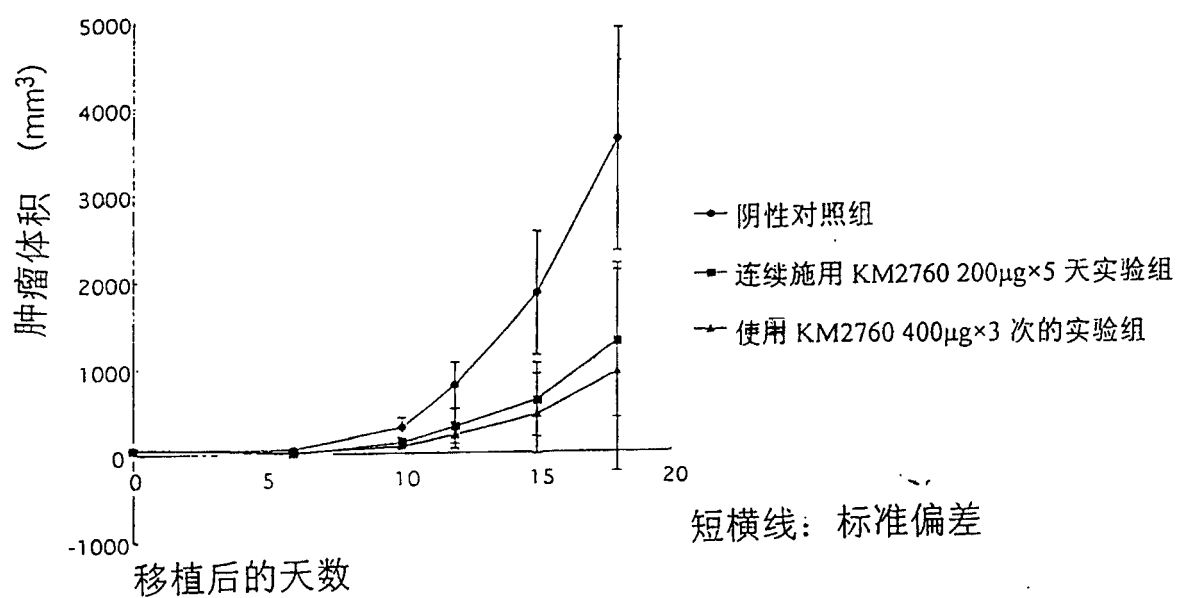


FIG.17

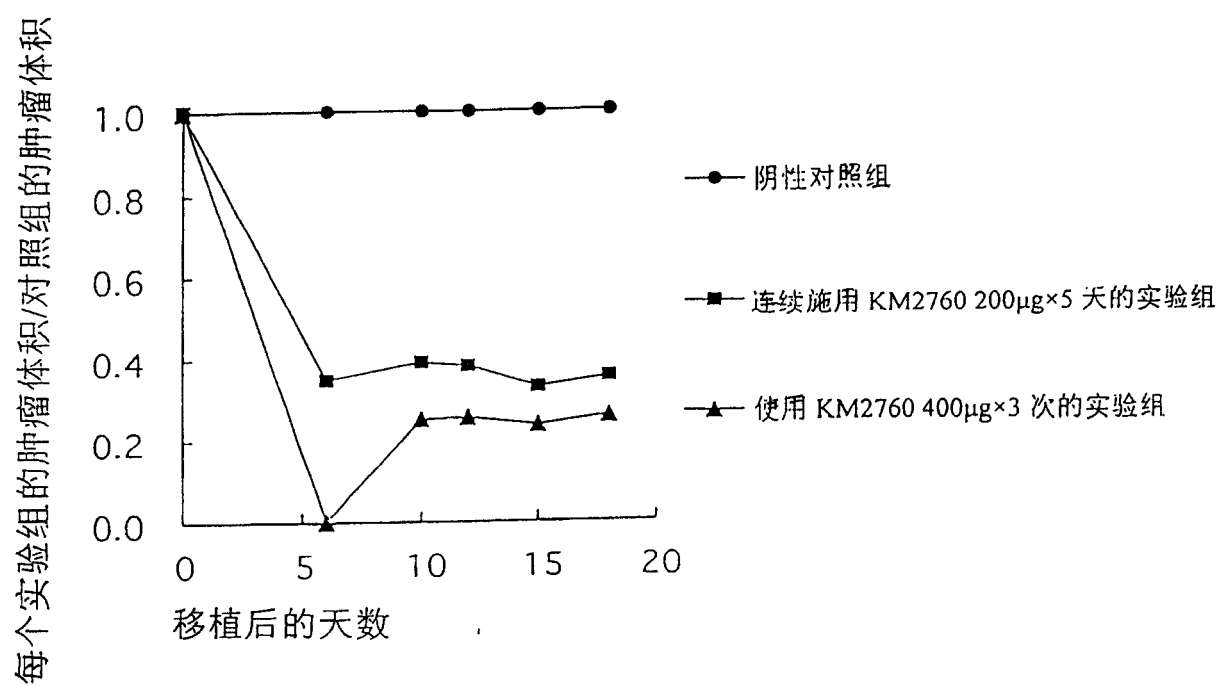
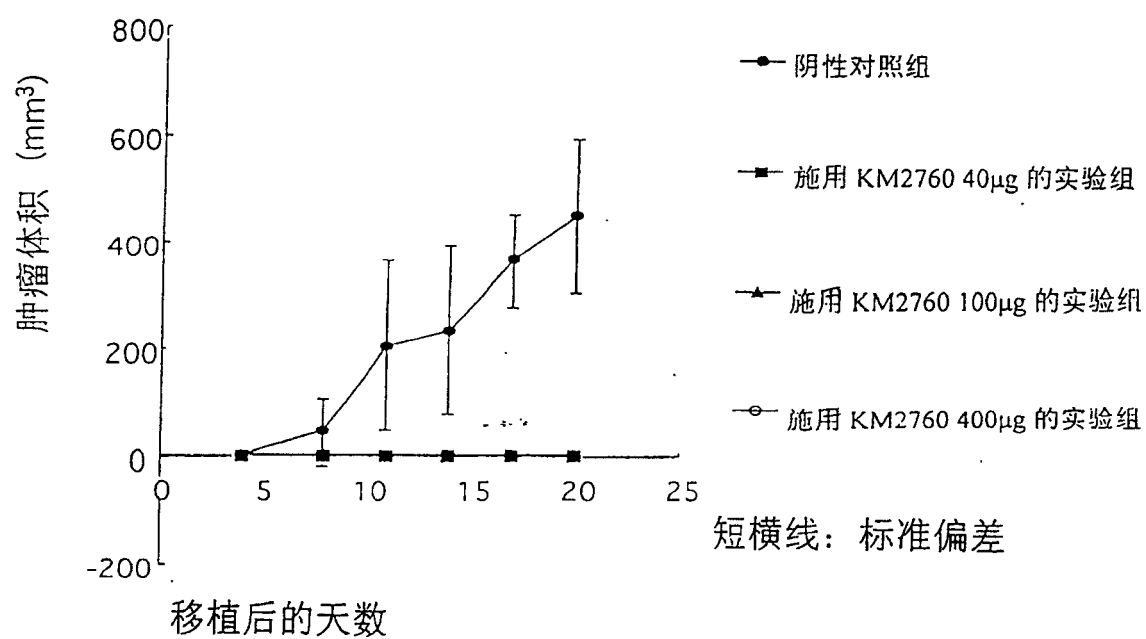


FIG.18



专利名称(译)	基因重组抗体及其抗体片段		
公开(公告)号	CN100455599C	公开(公告)日	2009-01-28
申请号	CN01805990.2	申请日	2001-03-02
申请(专利权)人(译)	协和发酵工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和发酵工业株式会社		
[标]发明人	设乐研也 花井陈雄 庄司绘美 樱田千子 古谷安希子 中村和靖 丹羽伦平 柴田健志 山崎基生		
发明人	设乐研也 花井陈雄 庄司绘美 樱田千子 古谷安希子 中村和靖 丹羽伦平 柴田健志 山崎基生		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/28 C12N15/13 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 A61K39/395 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/14 A61P37/08 G01N33/543		
CPC分类号	C07K16/2866 G01N33/543 C07K2319/00 C07K2317/565 C07K2317/732 A61K2039/505 C07K2317/24 G01N2333/78 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P27/00 A61P27/14		
代理人(译)	杨青		
优先权	2000059508 2000-03-03 JP 2000401563 2000-12-28 JP		
其他公开文献	CN1407993A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种与人CCR4胞外区域特异作用的基因重组抗体或抗体片段；一种编码所述基因重组抗体或抗体片段的DNA；一种产生所述基因重组抗体或抗体片段的方法；一种免疫学检测CCR4的方法，一种免疫学检测在细胞表面表达CCR4的细胞的方法，一种用于减少或去除在细胞表面表达CCR4的细胞的方法，以及一种用于抑制Th2细胞因子产生的方法，每一种均使用上述的基因重组抗体或其片段；用于Th2-介导的免疫疾病的药物、治疗剂或诊断剂和用于血癌的治疗剂或诊断剂，每种均含有上述的基因重组抗体或其片段作为活性成分。

$$\text{细胞毒性活性(\%)} = \frac{(\text{样品上清的}^3\text{H} \text{ 的量}) - (\text{自发释放的}^3\text{H} \text{ 的量})}{(\text{总}^3\text{H} \text{ 的量}) - (\text{自发释放的}^3\text{H} \text{ 的量})} \times 100$$